



Etude du mode d'action et du devenir d'un herbicide : l'aclonifen

O. Kilinc

► To cite this version:

O. Kilinc. Etude du mode d'action et du devenir d'un herbicide: l'aclonifen. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00554905

HAL Id: tel-00554905

<https://theses.hal.science/tel-00554905>

Submitted on 11 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE GRENOBLE

École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Etude du mode d'action et du devenir
d'un herbicide : l'aclonifen

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 07 juillet 2010
pour l'obtention du titre

Docteur de l'Université de GRENOBLE

Par

Özgür KILINC

Composition du Jury :

Rapporteurs :

M. Gérard Ledoigt

M. François Laurent

Examineurs :

Mme. Anne Maître (Présidente du jury)

M. Renaud Grasset

M. Bernard Couloume

M. Patrick. Ravanel

M. Stéphane Reynaud

Laboratoire d'écologie Alpine-UMR 5553

Remerciements

Le présent manuscrit rend compte des résultats obtenus au bout de 3 ans de recherche. Mais ce travail n'aurait jamais pu aboutir les aides et précieux soutiens que j'ai reçu tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement en tout premier lieu le Professeur Prof. Patrick RAVANEL qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mes stages de master 1 et master 2. Tout au long de ces trois années, il a su orienter de son regard mes recherches aux bons moments en me faisant découvrir la pensée scientifique, tout en tirant partie de ma propre formation. Malgré son emploi de temps toujours chargé, il a toujours été disponible pour d'intenses et fructueuses discussions. Pour tout cela, sa confiance et son soutien financier en fin de thèse et surtout son amitié et son rôle de "papa". Pour m'avoir "adopté" je le remercie vivement, sans lui je ne serais pas là.

Je remercie mon co-directeur de thèse Stéphane Reynaud, pour le temps qu'il a pu me consacrer malgré son emploi du temps déjà bien rempli, merci pour ses précieux conseils et son rôle de grand frère.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse Pr Gérard Ledoigt (Clermont-Ferrand) et Dr François Laurent (INRA Toulouse) pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Professeur Anne Maître (Université de Grenoble), ainsi que Renaud Grasset et Bernard Couloume de Bayer CropScience Lyon.

Je tiens à remercier Laurent Perez de Bayer CropScience (Lyon) qui a trouvé le support financier de ce travail, que soient, également remerciées les nombreuses personnes avec qui nous avons pu collaborer dans le cadre de ce travail. Merci pour la source radioactive l'aclonifen fournit par Dr. Christian Beier (Bayer CropScience AG Wuppertal Allemagne) à la demande de Géraldine Emeric (Lyon).

Merci à tous nos partenaires de Bayer CropScience Lyon (Laurent Perez, Christian Lasselin, Franck Ledoux, Géraldine Emerice, Renaud Grasset et Bernard Couloume) qui depuis mon stage de Master 2 Recherche ont suivi et orienté mon travail. Merci à Christian Lasselin pour les semences d'adventices fournies avec célérité.

Merci également à Floralis, particulièrement Nicole Giraud et Véronique Michon, pour leurs travaux de l'ombre dans les négociations du contrat et leur gestion financière.

Grand merci à Michel Tissut qui est le doyen de l'équipe PEX. Je le remercie pour sa relecture attentive et constructive du présent manuscrit. Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre sur les Herbicides grâce à lui, Tu m'as donné toujours de bonnes stratégies pour mes travaux dès le matin, pendant des poses café. J'espère que je ne t'ais pas déçu.

Merci à Juliette Asta pour ses biscuits et ses délicieux chocolats et pour sa chaleur humaine qui vient de la méditerranéenne.

Je remercie Muriel Raveton particulièrement pour la réalisation des analyses en chromatographie CPG-masse et ses conseils scientifiques très utiles. Je remercie à Bernard Bramsse et Stéphanie Boulanger pour les analyses de HPLC-masse. (Cermav Grenoble)

Merci à Sylvie, Joëlle et Thierry pour votre aide et votre efficacité merci de votre amitié. Merci à Olivier Lontin pour l'informatique il a toujours été mon sauveur disponible pour mes soucis informatiques et mais encore plus pour supporter mes blagues.

Merci à Lucile Sage pour le temps passé à m'écouter, pour son amitié et pour les approvisionnements en nourritures.

Merci Philippe Choler, Serge, Bello, Roland, Jacky, Bernard, Olivier.

Je me devais d'associer mes camarades thésards dans ces remerciements. Tarafa, Abdé (mes grands frères), merci à Mickaël, binôme de Master 1 et collègue de bureau depuis toujours et j'en suis très content, merci à Angélique que je connais depuis Master 1, (Rodolphe « gentil Rodolphe », Asam, Claire et Aurélien, Matthieu (Arvernia), Bahar, Lucie, Bruno, Alexia, Bénédicte, Alice, Margot, Guillaume, Emma, Romain, Catherine, Séb, Rourou, Mathieu, David, Fabrice, Francesco, Cécile, Laure, Tamara, Sébastien, Jonathan, Marie, Nicolas, Olivier, Patrick et mes camarades (pour leur amitié et services infinis depuis mon M1.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu oublier ici et auxquelles je demande leur indulgence.

Je n'oublierai pas les aides permanentes reçues du personnel administratif du LTCA.

Merci Irène (Till) pour ses encouragements infinis. C'est avec qui j'ai commencé à travailler en Master 1 avec le « trèfle ».

Enfin, une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une paillasse, un café, un repas :... et toute la troupe du très convivial Laboratoire d'Ecologie Alpine

En dehors du laboratoire, Il existe une autre vie, avec plein d'amis! Merci à tous, en particulier, les familles OZCELIK (Mustafa, Ayse, cevdet, Kezban, Osman), DARICI (Nursen, Osman et leurs enfants) et UNAL qui m'ont soutenu pendant mon séjour en France.

Je remercie surtout ma famille que je n'ai jamais oubliée.

Liste des abréviations

ACTA	Association de Coordination Technique Agricole
AMM	Autorisations de Mise sur le Marché
BCF	The bioconcentration factor (facteur de bioconcentration) ^o
car	Caroténoïdes
CCM	Chromatographie sur couche mince
chl	Chlorophylles
DEM	Diethyl maleate
DIM	Diclofop-Méthyl
DJA	Dose Journalière Admissible
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DO	Densité Optique
DPE	Diphenylethers
DPM	Désintégrations Par Minute
DT50	Disparition de 50% de la dose
DT90	disparition de 90% de la dose
ϵ	Extinction Moléculaire
EFSA	The European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
EC50	Effect Concentration 50%
GST	Glutathion S-transférases
HR	L'humidité relative de l'air (ou degré d'hygrométrie),
K _{oc}	Coefficient d'adsorption
K _{ow}	Coefficient de partage octanol/eau moyenne
LC50	Un produit chimique ayant une concentration létale
LD50	L dose de causant la mort de 50 % d'une population animale
Log K _{oc}	Coefficient d'adsorption
Log P	Coefficient de partage octanol/eau
MF	Masse Fraiche
MS	Masse Séche
NBT	NitroBlue Tetrazolium
NEAO	Niveau d'exposition Acceptable pour l'Opérateur (mg kg-1 de poids)
NOEC	No Observed Effect Concentration
OMS/WHO	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)
P ₄₅₀	Cytochromes P450
PBO	Piperonyl butoxide
PPOIX	Protoporphyrin IX
R50	Très toxique pour les organismes aquatiques
R53	Peut entraîner des effets néfastes à long terme dans l'environnement aquatique
Rf	Rapport frontal ou rétention frontale. Hauteur de la tache/hauteur du front du solvant
ROS	Reaction Oxygen Species
S60	Eliminer le produit et son récipient comme un produit dangereux
S61	Eviter le rejet dans l'environnement.
SC	Suspension concentré

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION GENERALE	14
A) L'histoire des herbicides.	15
B) La famille des herbicides diphényléthers.	19
C) L'aclonifen.	21
1) Description de la formule chimique :	21
2) Principales propriétés physico-chimiques de l'aclonifen :	21
3) Utilisation de l'aclonifen :	22
4) Devenir environnemental de l'aclonifen :	24
5) Métabolites trouvés dans les plantes (sans spécification) :	25
D) La thématique scientifique abordée avec nos partenaires	27
MATERIEL ET METHODES.....	28
A) Plantes utilisées et modes de culture :	28
B) Les substrats des cultures :	29
C) Les appareils de mesure utilisés :	29
D) Détermination pratique du logP de l'aclonifen :	30
1) Mesure du coefficient de partition octanol/eau pour l'aclonifen	30
2) Mesure du coefficient de partition huile/eau pour l'aclonifen :	32
CHAPITRE I: SYMPTOMATOLOGIE LIEE A L'EFFET HERBICIDE DE L'ACLONIFEN.....	33
A- Matériels et méthodes :	34
1) Plantes utilisées :	34
2) Herbicides utilisés :	35
3) Traitement des plantes par les herbicides étudiés.	39
4) Détection de la matière active et des pigments photosynthétiques : dosages.	35
B- Résultats :	36
1) Mise au point des outils analytiques d'étude de l'aclonifen : extraction-dosage :	36
2) Mise au point d'un système chromatographique permettant la mise en évidence de l'aclonifen :	38
3) Analyse spectrophotométrique d'une solution éthanolique d'aclonifen :	39
4) Mise en évidence et caractérisation des symptômes liés à l'aclonifen :	39
5) Observation au laboratoire des symptômes visibles liés à l'activité de l'aclonifen :	40
6) Effet de l'aclonifen sur la croissance des plantules de blé et de maïs :	45
7) Mise en place d'une culture sur un substrat jouant un rôle adsorbant vis-à-vis des pesticides :	53
8) Chronologie d'apparition des symptômes en sable contaminée:	54
C-Discussion :	55
CHAPITRE II. MODE D'ACTION DE L'HERBICIDE ACLONIFEN.	57
A) La biosynthèse des chlorophylles et son blocage.....	58
B) La biosynthèse des caroténoïdes et son blocage.	60

C) Matériels et méthodes :(Pour préciser les modes d'action herbicides de l'aclonifen.)	61
1) Détermination des ROS (Reaction Oxygen Species) produits dans les feuilles.....	62
2) Mise en évidence d'un effet DPE de l'aclonifen sur cotylédons de concombre.	62
D) Résultats	63
1) Comparaison aclonifen/acifluorfen sur blé (figure II, 3)	63
2) Mise en évidence d'un effet de l'aclonifen sur la biosynthèse des caroténoïdes.....	66
3) Existence d'un effet de l'aclonifen sur la biosynthèse des chlorophylles/cytochromes.....	69
4) Mise en évidence du rôle d'une <i>accumulation</i> de la protoporphyrine IX dans les cotylédons de concombre traités à l'acifluorfen et à l'aclonifen.....	71
5) Démonstration de la production de ROS induite par la <i>lumière</i> dans du maïs traité par de l'aclonifen ou de l'acifluorfen.....	72
6) Commentaires sur les symptômes de dépigmentation et nécroses.	73
C) Discussion :	74
CHAPITRE III : PENETRATION - TRANSFERT DE L'ACLONIFEN DANS LA PLANTE.....	76
I) Pénétration- transfert : le cas de la plantule de blé.....	77
A) Matériels et méthodes.	77
B) Résultats.	78
II) Pénétration de l'aclonifen dans des fragments de racines en survie.....	86
A) Matériel et méthodes.	87
B) Résultats	88
III) Pénétration transcuticulaire de l'aclonifen dans des fragments foliaires en survie....	95
A) Matériels et méthodes	95
B) Résultats	101
C) Conclusions :.....	115
CHAPITRE IV : MESURE DE LA PARTITION DE L'ACLONIFEN ENTRE L'EAU ET DIFFERENTES SOLS ET SUBSTRATS.....	148
I) Partition de l'aclonifen entre l'eau et différents types substrats :.....	120
A) Matériel et méthodes.....	120
B) Résultats.	123
II) Partition de l'aclonifen entre l'eau et des argiles et l'eau et l'acide humique.....	130
A) Matériel et méthodes.....	131
C) Résultats	132
III) Vers un réalisme agronomique : évolution sur 120 jours de la teneur en aclonifen dans l'eau et le substrat lors d'un traitement à la dose agronomique.....	137
A) Matériel et méthodes.....	137
B) Résultats.	138
CHAPITRE V : A LA RECHERCHE D'UNE SELECTIVITE DU COLZA VIS-A-VIS DE L'ACLONIFEN	148
I) Mise en place d'un traitement de post-levée sur colza avec le Challenge 600.	149
A) Matériel et méthodes.....	149
B) Résultats	152
II) Recherche d'une sélectivité colza/aclonifen en évitant au maximum le contact de l'herbicide avec la semence et la plantule de colza.....	163

A) Matériel et méthodes :	163
B) Résultats :	164
C) Conclusions :	176
CHAPITRE VI : LA SELECTIVITE DU TOURNESOL (ET DU MAIS) VIS-A-VIS DE L'ACLONIFEN : UN EQUIPEMENT ENZYMATIQUE ADAPTE.	178
A) Matériel et méthodes :	178
1) Peut-on mettre en évidence des symptômes de «bleaching» et de nécroses chez le tournesol en présence d'acilonifen ?	178
2) Comportement du tournesol suite à un traitement de prélevée « homogène ».	178
3) Comportement du tournesol suite à un traitement de pré-levée appliqué sur la totalité du substrat.	179
4) Comportement du tournesol suite à un traitement de pré-levée réalisé au sein de toute la masse d'un substrat peu propice à bien retenir l'acilonifen : le sable de rivière.....	179
5) Comportement du tournesol suite à un traitement de post-levée	181
6) Comportement du tournesol suite à un chargement par infiltration sous vide de l'acilonifen de feuilles excisées.....	181
B) Résultats :	182
1) Présence de l'acilonifen dans les différents organes du tournesol suite aux différents traitements effectués ci-dessus	182
2) La situation du maïs vis-à-vis de l'acilonifen.	186
3) Présence de métabolites de l'acilonifen dans les organes souterrains de plantules de tournesol et de maïs traités en pré-levée.	192
4) Pénétration et métabolisation de l'acilonifen dans les feuilles chez le tournesol	200
5) Obtention in vitro de métabolites de l'acilonifen à l'aide d'extraits enzymatiques issus du tournesol.	203
6) Effet d'un inhibiteur des GST infiltré à l'intérieur des feuilles de tournesol.	205
7) Les P ₄₅₀ sont-ils impliqués dans la transformation de l'acilonifen chez le tournesol ?	208
8) Mise en évidence de mécanismes de détoxification de l'acilonifen par la plantule de maïs.....	209
C) Conclusion :	213
CONCLUSION.....	215
A) Pouvoir herbicide de l'acilonifen, efficacité : une atteinte de processus vitaux à clarifier..	215
1) L'acilonifen : structure et mode d'action	215
2) Synergie, additivité, complémentarité ?	216
3) Concentration critique de l'herbicide acilonifen ?	217
4) De l'application au champ à la concentration critique dans les parties aériennes :	218
5) Variations des effets physiologiques liés à l'emploi de l'acilonifen :	220
6) L'intérêt agronomique de l'acilonifen – Eventail des cultures :	221
7) La sélectivité du tournesol vis- à vis de l'acilonifen :	223
8) Un métabolisme spécifique du tournesol ?	223
9) Faut-il formuler différemment l'acilonifen?	224
10) Résilience de l'acilonifen. Impact environnemental :	224
B) Réflexion générale :	225

LISTE DE FIGURES

Figure I, 1 : Illustration de symptômes particuliers obtenus après traitement racinaire avec l'aclonifen en comparaison avec un DPE classique : l'acifluorfen.....	34
Figure I, 2 : Schéma d'extraction, à partir du produit formulé, l'aclonifen.....	37
Figure I, 3 : Spectre UV/visible d'une solution éthanolique d'aclonifen.....	38
Figure I, 4 : Symptômes de dépigmentation foliaire sur plantules éclairées de maïs.	41
Figure I, 5 : Cumul des longueurs des racines de plantules de blé âgées de 25 jours.....	45
Figure I, 6 : Cumul des longueurs des racines de plantules de maïs âgées de 25 jours	45
Figure I, 7 : Effets d'une concentration croissante en aclonifen sur l'élongation foliaire de plantules de blé.....	46
Figure I, 8 : Effets d'une concentration croissante en aclonifen sur l'élongation foliaire de plantules de maïs	46
Figure I, 9 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche, la masse sèche et la teneur en eau (%) de feuilles de plantules de blé	47
Figure I, 10 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche, la masse sèche et la teneur en eau (%) de feuilles de plantules de maïs.	48
Figure I, 11 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche, la masse sèche et la teneur en eau (%) de racines de plantules de blé.....	49
Figure I, 12 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche, la masse sèche et la teneur en eau (%) de racines de plantules de maïs.....	49
Figure I, 13 : Contenu pigmentaire de plantules de blé de 12 jours :	50
Figure I, 14 : Contenu pigmentaire de la feuille n°2 de plantules de maïs de 12 jours :	51
Figure I, 15 : Fragments de feuille de maïs (feuille n° 2) âgés de 12 jours..	52
Figure I, 16 : Contenu pigmentaire de fragments foliaires prélevés sur des plantules de maïs	52
Figure I, 17 : Illustration photographique de la cinétique d'apparition des symptômes.....	54
Figure II, 1 : Blocage de la biosynthèse des chlorophylles par les diphényléthers vrais (DPE).58	
Figure II, 2 : La voie de biosynthèse chloroplastique des caroténoïdes à partir du phytoène....	61
Figure II, 3 : Effet de l'aclonifen, de l'acifluorfen et du norflurazon sur plantules de blé.	65
Figure II, 4 : Effet sur la composition pigmentaire de différents herbicides.	67
Figure II, 5 : Mise en évidence de l'accumulation du phytoène.	68
Figure II, 6 : Symptômes de dépigmentation et de nécroses observés à la lumière, sur des fragments cotylédonaire de concombre.	70
Figure II, 7 : Effet nécrotique photo-dépendant dans des feuilles cotylédonaire de concombre infiltrées avec une solution de protoporphyrine IX exogène..	71
Figure II, 8 : Détermination fluorométrique de l'accumulation de protoporphyrine IX dans des plantules de maïs étiolées.	72
Figure II, 9 : Démonstration de la production de ROS	73
Figure III, 1 : Structure d'un caryopse de blé avant germination.	77
Figure III, 2 : Evolution de la masse fraîche d'une plantule de blé cultivée sur sable.....	79
Figure III, 3 : Evolution des concentrations en aclonifen dans des feuilles de plantules de blé.83	
Figure III, 4 : Visualisation du marquage progressif de plantules de blé cultivées sur sable traité à l'aclonifen ¹⁴ C.	86
Figure III, 5 : Cinétique de pénétration de l'aclonifen dans des racines de maïs excisées.	89
Figure III, 6 : Grandes étapes d'extraction, de purification et de marquage des cristaux.....	96
Figure III, 7 : Aspect des plants de colza au moment de la mise en expérimentation.	97
Figure III, 8 : Photographies illustrant la mise en suivie de fragments foliaires de colza.	99

Figure III, 9 : Pourcentage de pénétration en fonction du temps de l'aclonifen déposé sur disques foliaires de colza.....	103
Figure III, 10 : Répartition , après 2 h d'expérimentation, de l'aclonifen déposé sur disques foliaires de colza.....	104
Figure III, 11 : Concentrations internes mesurées dans des disques foliaires de colza traités par dépôt de gouttes de solution aqueuse.	105
Figure III, 12 : Concentrations internes mesurées dans des disques foliaires de colza traités par dépôt de gouttes de suspension aqueuse contenant 4,5 mg/ml d'aclonifen.	106
Figure III, 13 : Pourcentage de pénétration en fonction du temps de l'aclonifen déposé sur disques foliaires de vulpin.....	108
Figure III, 14 : Concentrations internes mesurées dans des fragments foliaires de vulpin traités par dépôt de gouttes de solution aqueuse.	110
Figure III, 15 : Concentrations internes mesurées dans des fragments foliaires de vulpin traités par dépôt de gouttes de suspension aqueuse contenant 4,5 mg/ml d'aclonifen..	110
Figure III, 16 : Concentrations internes mesurées dans des fragments foliaires de vulpin traités par dépôt de gouttes de suspension aqueuse contenant 9 mg/ml d'aclonifen..	111
Figure III, 17 : Pourcentage de pénétration de l'aclonifen à 24h dans des feuilles de plantules de tournesol.	113
Figure III, 18 : Concentrations internes en aclonifen (nmol/mgMS) dans des feuilles de tournesol traitées en dépôt de gouttes formulées différemment.....	114
Figure III, 19 : Cinétique de la pénétration de l'aclonifen dans des feuilles de tournesol après application de la matière active à 4,5 mg/ml.....	115
Figure III, 20 : Cristaux d'aclonifen observés au microscope (x 400).....	118
Figure III, 21 : Photographies de surfaces foliaires de tournesol, colza, vulpin.	119
Figure IV, 1 : Dispositif expérimental pour la mesure de partition de l'aclonifen entre l'eau et un substrat.....	120
Figure IV, 2 : Protocole d'extraction de l'aclonifen restant dans le substrat en fin d'expérimentation (43 jours).....	122
Figure IV, 3 : Bilan de la récupération de l'aclonifen à T ₄₃ jours dans les quatre substrats	125
Figure IV, 4 : Autoradiographie des extraits acétoniques obtenus à T ₄₅ jours de contact entre l'eau additionnée d'aclonifen et différents substrats.....	127
Figure IV, 5 : Evolution du rapport de partition de l'aclonifen retenu sur le substrat sable vis-à-vis de l'aclonifen retenu dans l'eau.....	129
Figure IV, 6 : Pourcentages de répartition de l'aclonifen entre la phase aqueuse et le substrat sable en fin d'expérimentation de partition (après 83 jours).....	130
Figure IV, 7 : Evolution du facteur de partition de l'aclonifen entre un substrat formé d'acide humique (Sigma) et l'eau.	132
Figure IV, 8 : Evolution du facteur de partition de l'aclonifen entre un substrat formé de montmorillonite et l'eau.....	132
Figure IV, 9 : Evolution du facteur de partition de l'aclonifen entre un substrat formé de kaolin et l'eau.....	133
Figure IV, 10 : Répartition de la radioactivité entre le substrat kaolin et l'eau après 72 de partage entre ces deux phases.....	134
Figure IV, 11 : Répartition de la radioactivité entre le substrat montmorillonite et l'eau après 72 de partage entre ces deux phases.....	136
Figure IV, 12 : Répartition de la radioactivité entre le substrat acide humique et l'eau après 72 de partage entre ces deux phases.....	137
Figure IV, 13 : Récupération de la radioactivité par différents solvants à partir d'un g de substrat traité par une solution acétonique d'aclonifen.....	139

Figure IV, 14 : Comparaison de la disponibilité de l'aclonifen présent de manière homogène dans un g de sol mesurée à T0 et T 48h..	140
Figure IV, 15 : Autoradiographie de 3 « carottes » identiques issues d'un prélèvement à T30 jours.....	141
Figure IV, 16 : Autoradiographie d'une «carotte» de sol prélevée à T120j.....	142
Figure IV, 17 : Répartition de l'aclonifen dans la profondeur du sol suite à un traitement homogène en surface.....	143
Figure IV, 18 : Evolution sur une période de 120 jours du stock d'aclonifen appliqué à la dose agronomique en couche homogène sur un sol agricole.....	144
Figure IV, 19 : Autoradiographie de chromatogrammes d'extraits acétoniques de carottes de sols prélevées à différentes dates (90-100 -120 jours) après traitement à l'aclonifen. ...	145
Figure V, 1 : Dispositif expérimental de culture pour colza et adventices.	149
Figure V, 2 : Etat de la culture lors du traitement de post-levée précoce.....	148
Figure V, 3 : Photographies de plantes après traitement et apparition des symptômes..	152
Figure V, 4 : Etat de croissance des plantes : colonne de droite photographies des témoins au moment du dosage,.....	153
Figure V, 5 : Evolution de la masse fraîche des parties aériennes chez des plantes traitées à l'aclonifen.....	154
Figure V, 6: Concentrations en aclonifen mesurées dans les parties aériennes de différentes espèces soumises à un traitement de prélevée.....	156
Figure V, 7: Photographies des plantes ayant subi le traitement post-levée précoce.....	157
Figure V, 8 : Concentration interne en aclonifen dans les parties aériennes de plants.	157
Figure V, 9: Etat de la culture en pot à T50.	159
Figure V, 10 : Comparaison par photographie (a) et par autoradiographie (b) de deux feuilles de colza.....	161
Figure V, 11 : Photographie d'un <i>Equisetum</i> sp. qui développé en présence d'aclonifen.....	163
Figure V, 12 : Schéma expérimental précisant la position de la couche de sol contaminé par l'aclonifen.....	164
Figure V, 13 : Plantules de vulpins, moutardes blanches et colza après 20 jours de culture...	166
Figure V, 14 : Concentrations en aclonifen présentes dans les parties aériennes de colza, vulpin et moutarde blanche	166
Figure V, 15 : Concentrations en aclonifen présentes dans les parties souterraines de colza, vulpin et moutarde blanche.	168
Figure V, 16 : Répartition de l'aclonifen dans différentes parties d'une moutarde blanche....	169
Figure V, 17 : Représentation graphique du contenu en aclonifen dans les parties aériennes et les parties souterraines de vulpins.....	174
Figure V, 18 : Représentation graphique du contenu en aclonifen dans les parties aériennes et les parties souterraines de colza	175
Figure V, 19 : Représentation graphique du contenu en aclonifen dans les parties aériennes et les parties souterraines de moutarde blanche s.....	176
Figure VI, 1 : Photomontage représentant une plantule de tournesol cultivée en pot.....	179
Figure VI, 2 : Variations des concentrations en pigments de tournesol.....	180
Figure VI, 3 : Comparaison du chevelu racinaire de plantes témoins et traitées à l'aclonifen.	181
Figure VI, 4 : Concentrations et pourcentages en aclonifen dans les différents compartiments de la plantule de tournesol traitée en pré-levée.....	183
Figure VI, 5 : Concentrations en aclonifen chez des plantules de tournesol	183
Figure VI, 6 : Comparaison des concentrations internes en aclonifen obtenues lors de deux types de traitement de pré-levée.....	184

Figure VI, 7 : Histogrammes de répartition de l'aclonifen dans les organes de plantules de tournesol de 21 jours soumises à un traitement herbicide de pré-levée.	186
Figure VI, 8 : Concentrations dans différents organes issus de plantules de maïs cultivées sur un mélange terre/terreau/sable totalement contaminé par de l'aclonifen.....	187
Figure VI, 9 : Effet de l'aclonifen appliqué en pré-levée dans la totalité du substrat sable à la dose agronomique sur la masse fraîche de plantules de maïs et tournesol.	189
Figure VI, 10 : Concentrations dans différents organes de plantules de maïs de 21 jours.	189
Figure VI, 11 : Comparaison des concentrations mesurées dans les racines et les parties aériennes de maïs et de tournesol cultivés 5 semaines.	191
Figure VI, 12 : Possibilités de mécanismes expliquant la sélectivité du tournesol.....	191
Figure VI, 13 : Autoradiographie d'un chromatogramme réalisé sur plaque de silice avec l'extrait méthanolique de racines de tournesol.....	194
Figure VI, 14 : Spectrophotométries des trois spots obtenus par chromatographie à partir d'extrait racinaire de tournesol.....	195
Figure VI, 15 : Autoradiographie et exemple de quantification d'un chromatogramme sur plaque de silice à partir d'extrait racinaire de tournesol.	197
Figure VI, 16 : Autoradiographies montrant les résultats chromatographiques obtenus suite à l'hydrolyse alcaline et acide d'un extrait polaire de racines de tournesol.	198
Figure VI, 17 : Autoradiographies de feuilles de plantules de tournesol.....	201
Figure VI, 18 : Autoradiographie d'extraits bruts de feuilles ayant subi un traitement foliaire par dépôt de goutte d'aclonifen marqué.....	202
Figure VI, 19 : Autoradiographie d'un chromatogramme illustrant la transformation des dérivés polaires de l'aclonifen obtenus après 48h par des feuilles de tournesol	203
Figure VI, 20 : Autoradiographie d'un chromatogramme présentant les différents dérivés de l'aclonifen obtenus <i>in vitro</i> dans différentes conditions expérimentales.....	205
Figure VI, 21 : .Autoradiographie d'un chromatogramme permettant de déduire le rôle joué par un inhibiteur des GST dans des feuilles de tournesol.	206
Figure VI, 22 : Résultats chromatographiques liés à une augmentation de la polarité du solvant de migration et mise en évidence d'un composé dérivé très polaire.....	207
Figure VI, 23 : Autoradiographie de cinétique de transformation <i>in vitro</i> de l'aclonifen mis en présence d'une activité enzymatique extraite de racines de maïs âgés de 15 jours..	210
Figure VI, 24 : Autoradiographie de la mise en évidence de l'aclonifen et de divers métabolites apparaissant <i>in vitro</i> lors d'incubations dans un tampon,.	211
Figure VI, 25 : Activités glutathion-S-transférases mesurées dans feuilles et racines.	212

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I, 1 : Comparaison des longueurs d'onde maximales et des coefficients d'extinction moléculaire obtenus à partir d'éthanoliques d'aclonifen	39
Tableau III, 1 : Evolution en masse des organes d'une plantule de blé.	80
Tableau III, 2 : Evolution en fonction du temps des concentrations internes en aclonifen dans les organes de plantules de blé.	81
Tableau III, 3 : Estimation des pertes d'eau par des coléoptiles de blé	82
Tableau III, 4 : Radioactivité mesurée dans l'eau du substrat et, après extraction, dans les différents organes de plantules de blé.	84
Tableau III, 5 : Evolution au cours du temps et organe par organe du facteur de concentration de l'aclonifen.....	84
Tableau III, 6 : Résultats expérimentaux de partition et diffusion de l'aclonifen dans des fragments racinaires de maïs.	88
Tableau III, 7 : Valeurs théoriques de la concentration interne racinaire de maïs.	91
Tableau III, 8 : Valeurs théoriques de la concentration interne racinaire de maïs	92
Tableau III, 9 : Cinétique de pénétration de l'aclonifen dans des racines de tournesol.....	93
Tableau III, 10 : Cinétique de pénétration de l'aclonifen dans des coléoptiles de maïs.	94
Tableau III, 11 : % de pénétration de l'aclonifen dans des disques foliaires de colza.....	102
Tableau III, 12 : Comparaison des pourcentages de pénétration de l'aclonifen dans des fragments foliaires de vulpin et colza	109
Tableau III, 13 : Comparaison des concentrations internes en aclonifen obtenues dans des fragments foliaires de vulpin et colza.	112
Tableau IV, 1 : Evolution au cours du temps de la teneur en aclonifen dans l'eau en équilibre avec les différents substrats utilisés.	123
Tableau IV, 2 : Evolution de la teneur en aclonifen dans l'eau associée à un substrat sable..	128
Tableau IV, 3 : Radioactivité retrouvée dans l'eau du partage et extrait du substrat kaolin....	134
Tableau IV, 4 : Valeur de radioactivité retrouvée dans l'eau du partage et extrait du substrat montmorillonite.....	135
Tableau IV, 5 : Valeur de radioactivité retrouvée dans l'eau du partage et extrait du substrat acide humique.	136
Tableau IV, 6 : Répartition de l'aclonifen extrait par différents solvants à partir d'un gramme de mélange préparé pour faire une couche de surface de sol.	139
Tableau V, 1 : Valeurs des masses fraîches des parties aériennes des plantes utilisées pour les dosages en aclonifen	154
Tableau V, 2 : Comparaison des concentrations en aclonifen atteintes dans les parties aériennes de vulpin, colza et moutarde sauvage.....	160
Tableau V, 3 : Contenu foliaire en aclonifen chez le colza suite à un traitement en post-levée tardive	160
Tableau V, 4 : Données expérimentales permettant de calculer la concentration en aclonifen accumulée dans les parties aériennes d'adventices	163
Tableau V, 5 : Concentrations moyennes en aclonifen dans les parties aériennes de vulpin, colza et moutarde blanche	166
Tableau V, 6 : Concentrations moyennes en aclonifen dans les parties souterraines de vulpin, colza et moutarde blanche	168

Tableau V, 7 : Comparaison des concentrations en aclonifen trouvées dans les parties aériennes et souterraines de colza, vulpin, moutarde blanche.....	168
Tableau V, 8 : Valeurs de concentrations en aclonifen obtenues dans les différents fragments isolés d'un plant de moutarde blanche.	170
Tableau V, 9 : Calcul de la concentration critique foliaire obtenue chez le vulpin dans différentes situations de symptômes.	173
Tableau V, 10 : Calcul de la concentration critique foliaire obtenue chez le colza dans différentes situations de symptômes..	174
Tableau V, 11 : Calcul de la concentration critique foliaire obtenue chez la moutarde blanche dans différentes situations de symptômes..	175
Tableau VI, 1 : Valeurs des teneurs en pigments dans les parties chlorophylliennes de feuilles de tournesol :	180
Tableau VI, 2 : Répartition de l'aclonifen associé aux différents organes des plantules de tournesol.	185
Tableau VI, 3 : Concentrations dans différents organes issus de plantules de maïs.	189
Tableau VI, 4 : Pics d'absorption entre 300 et 400 nm des spots récupérés dans l'éthanol à partir de l'extrait de racines de maïs	196
Tableau VI, 5 : Quantité de radioactivité extraite et de dérivés de l'aclonifen obtenus suivant les extraits de feuilles de tournesol	206

INTRODUCTION GENERALE

L'histoire de l'agriculture moderne est liée à l'utilisation de molécules de synthèse, destinées à limiter le développement d'espèces nuisibles dans les grandes cultures à savoir les adventices ou « mauvaises herbes », les insectes ravageurs des cultures ou des récoltes, les champignons parasites des cultures. Les substances actives sont formulées essentiellement afin d'optimiser leur distribution sur et dans les végétaux. Les matières formulées et commercialisées sont appelées produits phytosanitaires, agrosanitaires, ou phytopharmaceutiques. Le terme de « pesticide », origine anglo-saxonne est maintenant couramment utilisé en France.

Comme pour d'autres produits chimiques de synthèse tels les médicaments, les pesticides sont soumis à des Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) qui ne sont obtenues qu'après de nombreuses années de recherche engagées par les firmes phytosanitaires et une expertise publique nationale et européenne dont l'exigence augmente d'année en année. Pour s'en convaincre il suffit de regarder les dossiers d'homologation des années 50 et ceux des années 2000. Ces exigences croissantes des expertises ont porté surtout dans les domaines de la toxicologie et de l'éco-toxicologie. Aussi, la mise sur le marché d'une nouvelle molécule formulée n'est pas si facile pour les firmes actuelles et représente un engagement financier impressionnant de la part de firmes.

Une partie de cette exigence en terme d'homologation est à associer à la capacité de plus en plus grande et précise des analyses chimiques qui sont capables grâce à des appareils de mesure de plus en plus performants de détecter dans différentes matrices des traces très faibles de substances actives ou de leurs métabolites. Il n'y a pas matière à polémiquer sur la question de savoir si les pesticides sont capables de se disperser dans l'environnement : la réponse est évidemment oui. L'histoire du DDT retrouvé au niveau des graisses et des œufs des manchots empereurs vivant au Pôle Sud, très loin de toutes zones traitées, est là pour nous rappeler que le déversement volontaire et autorisé de molécules de synthèse dans l'environnement peut avoir des conséquences imprévues et involontaires sur la composition de l'atmosphère, de l'eau, des sols et des sédiments, de la biosphère. C'est à l'homme d'avoir l'intelligence, avec les connaissances qui sont les siennes, de définir soigneusement les usages des molécules performantes, de leurs formulations, et surtout les pratiques culturales d'application, afin de réconcilier agrosystèmes et écosystèmes.

A) L'histoire des herbicides.

En Europe, l'histoire de la chimie adaptée à l'agriculture démarre sur une situation dramatique en Irlande : la grande famine de 1848-1850 liée à des pertes considérables de l'aliment de base de ce pays : la Pomme de terre dont la culture est ravagée plusieurs années de suite par le mildiou. Le bilan est lourd : 1,5 million de morts de faim et autant de départs vers les Amériques. Ce sera la dernière famine du continent européen. On se tourne vers les chimistes qui pour l'essentiel font à l'époque de la chimie minérale. On finit par démontrer que des sels de cuivre (encore utilisés sous le nom commercial de « bouillie bordelaise ») et des produits à base de soufre, sont fongicides contre le mildiou (cuivre) et l'oïdium (soufre). L'activité biocide du cuivre est connue depuis longtemps, mais la recette de la Bouillie bordelaise semble avoir été découverte par le chimiste bordelais Ulysse Gayon et le botaniste Alexis Millardet au début des années 1880. Il a commencé à être utilisé sur la vigne vers 1885 dans le Bordelais.

La chimie minérale trouve de nouveau un emploi en culture céréalière lors du 1^{er} conflit mondial. La France très majoritairement agricole à l'époque voit ses paysans jeunes et moins jeunes appelés à d'autres activités que celles des champs. A l'époque l'agriculture est très manuelle, labour avec les juments, désherbage manuel à la houe. Ce désherbage ne peut être envisagé avec la seule force physique des femmes, enfants et vieillards. On va faire appel aux chimistes une nouvelle fois. Dans les cultures vivrières céréalières (principalement orge, avoine, blé) c'est H_2SO_4 qui est utilisé en post-levée, c'est-à-dire sur des plantules déjà développées (Cabanettes, 1986 ; Hascoet et Bourdin, 1988). Un tel traitement « brûle » la matière vivante et la jument qui tire l'appareil de traitement risque d'en pâtir. Aussi, recouvre-t-on d'un « tablier » cuir très épais l'animal exposé. Pourquoi les cultures de céréales échappent-elles au traitement ? Pour une raison de position : port dressé des plantules de céréales et apex terminal enfoui au cœur des gaines des feuilles, alors que les plantules de dicotylédones dont le port des cotylédons et des 1^{ères} feuilles est pratiquement horizontal reçoivent l'acide qui brûle la feuille et l'apex exposé de la plantule.

L'utilisation répétée sur plusieurs années de ce type de traitement sur les mêmes parcelles conduit à l'éradication des dicotylédones qui laissent ce que les écologistes appellent une niche écologique vide, vide qui va être rapidement occupé par des plantes sauvages qui ont le même port dressé que le blé ou l'avoine : les graminées sauvages pour l'essentiel. Le traitement répété a conduit à une inversion de flore ce qui conduit à dire qu'un problème réglé en agriculture peut en générer un autre imprévu.

Dans les années 1930 avec l'apparition des composés issus cette fois de la chimie organique de synthèse : les **phénols nitrés** (type DNOC, dinoterbe) on croit avoir trouvé les

remplaçants de l'acide sulfurique. Leur utilisation montrera que ces produits ne font pas mieux que l'acide, que lors du traitement il y a une sélectivité de position semblable à celle de l'acide : entre monocotylédones et dicotylédones. On découvrira beaucoup plus tard en laboratoire que ces produits sont des biocides capables de tuer tout type d'organismes vivants en raison de leur activité découplant des phosphorylations. Produits depuis 1930 il faudra attendre 1998 pour que le dernier phénol nitré homologué soit retiré du marché français.

A la fin des années 1930, les chimistes vont arriver à des molécules de synthèse organique qui miment les effets d'une hormone végétale dont on a déjà bien compris le mode d'action, il s'agit de l'auxine retrouvée aussi bien chez les dicotylédones que chez les monocotylédones. Ces molécules de synthèse miment l'action de l'auxine et sont appelées les « **auxines-like** » dont une quinzaine ou a eu un destin commercial. Toutes ces molécules sont elles aussi sélectives des monocotylédones, c'est-à-dire sans effet sur elles, alors qu'elles détruisent les dicotylédones même pérennes comme l'ortie ou la ronce. Tous les herbicides cités jusque là sont utilisés en traitements foliaires.

Pour contrôler les monocotylédones adventices des solutions vont émerger dans, les années 50-60. La cible biochimique qui apparaît évidente pour détruire une plante semble être la fonction caractéristique du végétal : la photosynthèse. En effet, le chloroplaste est le siège de synthèses de très grande importance :

- les chlorophylles qui captent l'énergie solaire,
- les caroténoïdes qui participent à la capture énergétique et protègent la chlorophylle de phénomènes d'oxydation,
- une chaîne de transfert d'électrons qui conduit à la photoréduction du CO_2 en matière organique carbonée.
- la synthèse de tous les acides aminés (aussi dans les plastes) à partir de l' NH_4^+ et d'acides organiques.

La période 1950-1960 a été très riche en synthèse de structures chimiques nouvelles ayant un potentiel herbicide avec utilisation possible en grandes cultures (Bourdin, 1983). Trois familles majeures ont été synthétisées et exploitées : **les phénylurées, les phénylcarbammates et les triazines**. Ces trois familles chimiques ont donné chacune plus d'une vingtaine de produits commerciaux dont certains sont encore en emploi (ex. l'isoproturon en culture de blé). Dans chacune de ces séries sont apparus des produits dés herbants totaux et des produits sélectifs de telle ou telle culture. On citera pour les phénylurées, l'isoproturon sélectif du blé, et, pour les triazines, l'atrazine sur maïs et sorgho (interdite depuis 2003 en France) et utilisé pendant près d'un demi-siècle en France à raison de 5000 t/an.

La cible biochimique de tous ces composés à structures chimiques différentes est la même : la chaîne de transfert des électrons est bloquée au niveau d'une protéine cible liée au transfert : la protéine D1. Ce transfert bloqué inhibe l'acte photosynthétique. Les électrons encore générés par l'excitation de la chlorophylle, passent sur l'O₂ cellulaire et forme de l'O₂[·] (Oxygène radicalaire qui attaque les systèmes membranaires produisant des nécroses. Ainsi, 3 séries chimiques différentes ne forment qu'une seule série physiologique. : Les inhibiteurs de la photosynthèse. (Edward et al., 1983 ; Böger et Sandmann, 1992 ; Devine et al., 1993).

Pour des raisons particulières de métabolisme certaines cultures échappent au blocage décrit ci-dessus. Ainsi, le maïs possède t-il un très fort potentiel de détoxification de l'atrazine (Shimabukuro, 1968 ; Shimabukuro 1973 ; Raveton et al., 1997).

Comme l'ensemble du règne animal, le règne végétal possède tout un arsenal enzymatique susceptible de dégrader les xénobiotiques (Dixon et al., 2002b; Edwards et al., 2000; Marrs, 1996 ; Dixon et al., 1998 ; Korte et al., 2000). En règle générale, la biotransformation consiste en la production de métabolites plus solubles que la molécule initiale et donc facilitant leur élimination (animaux) ou leur ségrégation dans les vacuoles (végétaux).

Les mécanismes d'action enzymatiques responsables de la biotransformation des xénobiotiques peuvent être classiquement divisés en trois phases (Sandermann, 1977, 1992 ; Coleman et al., 1997).

- les réactions de **phase I** ou de fonctionnalisation sont des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, permettent l'introduction ou la libération de fonctions chimiques polaires sur le xénobiotique favorisant ainsi l'action des enzymes de phase II. Les réactions d'oxydation sont principalement catalysées par les monooxygénases à cytochrome P450. Les hydrolyses sont réalisées par les estérases (Werck-Reichhart, 2000 ; Siminszky, 2006).

- les réactions de **phase II** ou de conjugaison sont des réactions d'addition d'une molécule endogène hydrosoluble sur le xénobiotique ou l'un de ses métabolites primaires. Ces réactions font intervenir des enzymes spécifiques du substrat endogène à conjuguer. Ainsi la glutathion S-transférase conjugue le glutathion (tripeptide), mais d'autres enzymes comme des glyco-transférases qui conjuguent des sucres peuvent être également impliquées chez les végétaux Il doit en manquer (Pflugmacher et al., 2000 ; Edwards et Dixon, 2005 ; Öztetik, 2008)

- la **phase III** correspond à élimination, hors du corps, des produits de la phase II par une procédure d'excrétion en phase aqueuse, en parallèle avec évacuation des produits de dégradation des constituants cellulaire. Les végétaux ne possèdent pas de fonction excrétoire équivalente à celle des animaux ni un milieu interne circulant équivalent au sang.

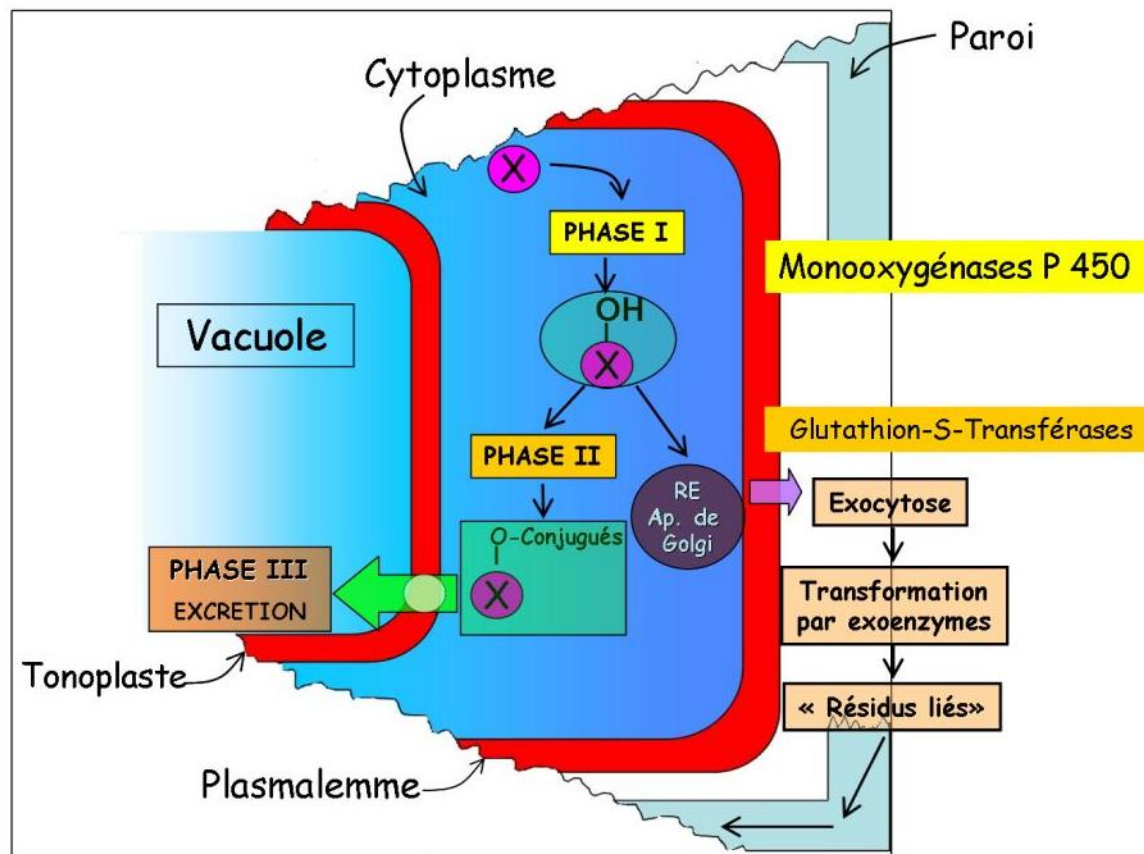


Figure: Phases de métabolisation des herbicides dans les cellules de la plante

A la suite de ces réactions les herbicides ont dans la majorité des cas perdu leur pouvoir toxique ou leur capacité à migrer vers les organes cibles (feuilles).

En dehors d'une grande possibilité d'hydroxylation racinaire il existe dans les feuilles des estérases et des Glutathion-S-Transférases (GST) qui inactivent l'herbicide au fur à mesure de sa pénétration ce qui rend impossible le blocage de la cible.

Avec ces trois séries herbicides, le problème des monocotylédones a été momentanément réglé. La sélectivité d'un produit vis-à-vis d'une culture est souvent le fait d'une ou plusieurs activités enzymatiques préexistantes ou induites chez la plante traitée. Une telle sélectivité est fortement recherchée pour les grandes cultures mais elles peuvent être révélées par le traitement chez des adventices qui, de ce fait ne seront pas détruites pour les mêmes raisons que la culture. C'est le cas classique des lignées résistantes de chénopodes blancs ou d'amarantes dont les populations explosaient en cultures de maïs suite aux traitements répétés à l'atrazine (Gasquez, 1981 ; Heap, 2007)

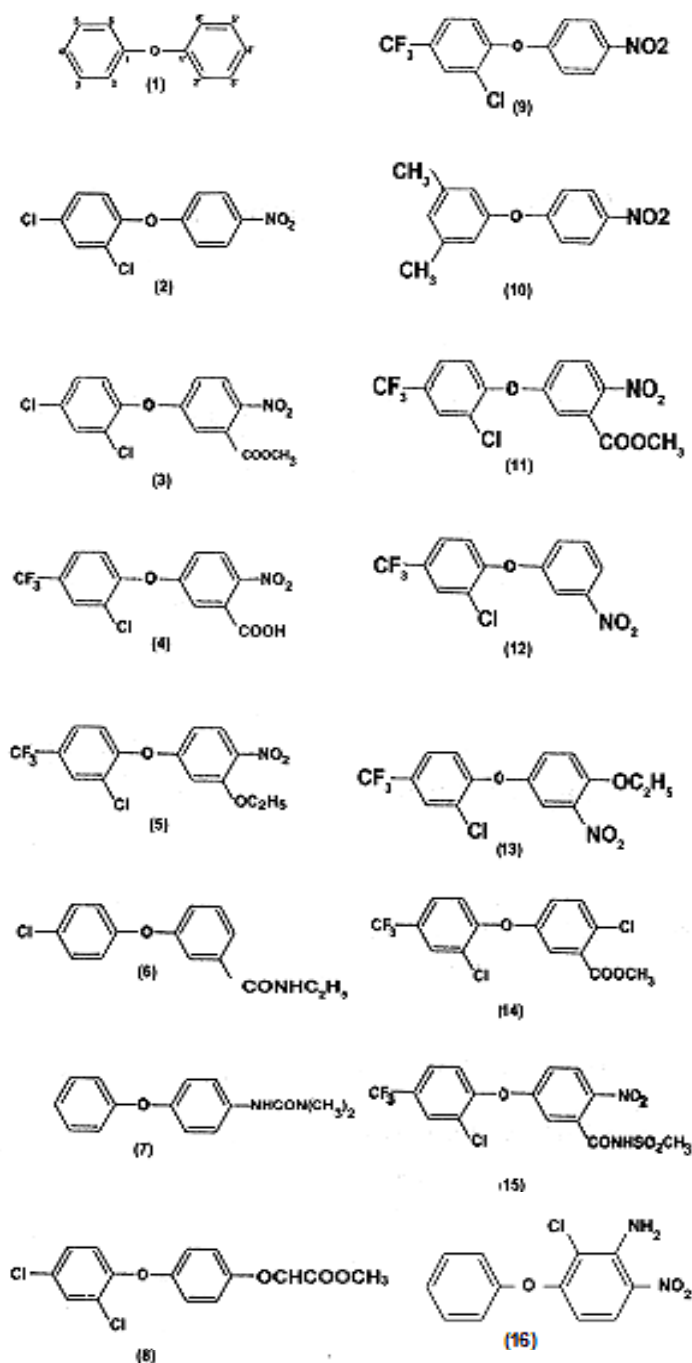
A regarder de près l'histoire des herbicides on constate qu'un problème réglé en engendre souvent un autre plus difficile à traiter. L'apparition des lignées résistantes par activité métabolique inactivant l'herbicide chez des plantes adventices, par un traitement répété, est

relativement lente car le rythme des générations des adventices à contrôler est en général d'un an. Alors que chez les insectes et les champignons, le temps de génération est bien plus court. Ainsi, pour régler le problème des mauvaises herbes elles même résistantes à une substances active sont apparus les mélanges de matières actives (2, parfois 3) avec chacune une cible biochimique différente et bien évidemment la nécessité d'une double, voire d'une triple résistance de la culture.

C'est dans ce contexte de recherche du contrôle d'adventices résistant à tel ou tel herbicide que sont apparus les inhibiteurs des voies de **biosynthèse des acides aminés** : le glyphosate pour les acides aminés aromatiques, le glufosinate pour l'ensemble des acides aminés, les sulfonilurées pour les acides aminés ramifiés (Amrhein et al., 1980). Plusieurs séries chimiques ont été développées pour bloquer la **synthèse d'acides gras** : thiocarbamates, FOP, DIM très actifs sur de nombreuses graminées adventices. Le blocage des synthèses des pigments est apparu comme une autre cible inhibiteurs de la **synthèse des chlorophylles** : les *diphényléthers* ou DPE et pour la **synthèse des caroténoïdes** des molécules, appartenant à des familles chimiques diverses, telles que le norflurazon, le diflufénicanil, la flurochloridone, l'aminotriazole (Devine et al., 1993 ; Böger et Sandmann, 1992)

B) La famille des herbicides diphényléthers.

Dans la littérature, au fil de notre étude bibliographique nous avons découvert une famille des diphényléthers riche d'une 30aine de structures différentes ayant eu ou ayant pour la plupart, un destin commercial (la série complète est probablement plus large). Les 15 structures présentées sont classées comme molécules ayant une activité herbicide. Ce sont pour la plupart des inhibiteurs d'une enzyme du stroma des chloroplastes : la protoporphyrinogène oxydase (Martinge et al., 1988) dont l'inactivation interdit la synthèse des chlorophylles et dont la conséquence, à la lumière, est une peroxydation membranaire à l'origine d'effets nécrotiques. Toutes ces molécules n'ont pas eu un destin commercial et celles qui sont commercialisées ne le sont pas partout. Enfin, certaines molécules ont été, au fil du temps, interdites d'usage en France, comme le nitrofen, le nitrofluorfen (Scalla, 1991) Les structures majeures des diphényléthers sont présentées ci-dessous :



1. noyau diphényléther
2. nitrofen
3. bifénox
4. acifluorfen
5. oxyfluorfen
6. S-3141 3 phénoxy-N-éthylbenzamide
7. chloroxuron
8. diclofop-méthyl
9. nitrofluorfen
10. DMNP p-nitrophényl 3,5-xylyléther
11. acifluorfen méthyl
12. 2-chloro-4-trifluorométhylphényl-3'-nitrophényléther
13. 2-chloro-4-trifluorométhylphényl-3'-nitro-4'éthoxyphényléther
14. LS 820340
15. fomesafen
16. aclonifen

Structures chimiques des principaux diphényléthers herbicides (d'après Gillham et Dodge, 1987)

Dans cette série chimique le produit phare du point de vue commercial semble être l'acifluorfen (forme sodium ou méthyle) avec une très forte utilisation sur soja en particulier sur l'ensemble du continent américain. (Witkowski et Halling., 1989). Cet herbicide n'est pas homologué en France. Un deuxième représentant de la famille semble fortement utilisé : l'oxyfluorfen sur soja en Amérique du nord et du sud, en Australie. En France, ce produit est autorisé spécialement en arboriculture et en vigne. Enfin, nous arrêterons cette liste par ordre d'importance avec le bifénox utilisé seul ou en mélange sur céréales d'hiver en France. Pour ces trois matières actives qui semblent être les plus commercialisées de la série diphényléthers

au niveau mondial nous n'avons pas réussi à trouver d'informations sur les tonnages utilisés par année.

C) L'aclonifen.

L'aclonifen est une molécule de synthèse découverte en 1977 par Celamerck GmbH & Co., devenu Shell Agrar, puis vendu à Rhône Poulenc Agrochimie. Cette matière active, actuellement propriété de Bayer CropScience, est classée parmi les herbicides. Cette activité phytotoxique fut rapportée pour la première fois en 1983 par Buck W. et collaborateurs (Buck et al., 1983) lors du 10^{ème} Congrès International sur la Protection des Plantes. Le brevet US de cette molécule correspond au matricule : Patent US 4394159 : DE 2831262.

1) Description de la formule chimique :

L'aclonifen ($C_{12}H_9ClN_2O_3$) dont la formule chimique figure ci-dessous, correspond selon la nomenclature IUPAC au 2-chloro-6-nitro-3-phénoxyaniline. Ce terme est synonyme de 2-chloro-6-nitro-3-phénoxybenzeneamine. Du point de vue structure chimique l'aclonifen appartient à la série des **diphényléthers ou DPE**.

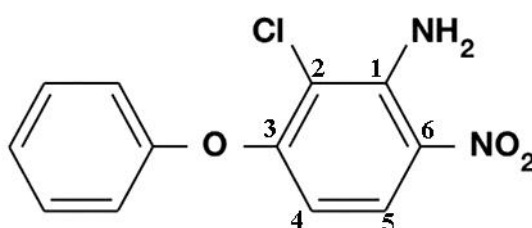


Figure : Formule de l'aclonifen.

2) Principales propriétés physico-chimiques de l'aclonifen :

Les principales propriétés chimiques de cette molécule sont brièvement présentées ici (EFSA Scientific Report, 2008).

- Sa masse moléculaire est de **264,7**.
- L'aclonifen se présente sous forme de cristaux inodores de couleur jaune, son point d'ébullition est à 81-82°C et sa tension de vapeur est de **1,6 x 10⁻² mPa (20°C)**.
- La constante de Henry (calculée) est de **3,03 10⁻³ Pa.m³mol⁻¹**.
- Le logK_{ow} ou logP retenu pour le dossier d'homologation est de **4,37**. Il faut noter à ce sujet que d'autres valeurs sont publiées dans la littérature (Nandihalli, 1993 ; Trevisan et al., 1999 (3,98) ; Ruelle, 2000) (valeurs situées entre 3,14 et 4,37).

Avec une telle valeur de partition octanol/eau il n'est pas étonnant que l'aclonifen soit peu soluble dans l'eau : 1,4 mg/l. Cette solubilité augmente dans des solvants organiques variés : hexane 4,8 g/l, méthanol 50 g/l, toluène 442 g/l, acétone 730 g/l,

- Cet herbicide est très faiblement dégradé à la lumière (demi-vie entre juin et août 200h, et en décembre 1400h, en condition agronomique).

- Les valeurs disponibles concernant la partition entre l'eau et le carbone organique (K_{oc}) des sols ou sédiments oscillent entre 5318 et 16000 (Viscetti et al, 2002 ; Trevisan et al., 1999) (moyenne de 7126 soit une valeur médiane de $\log K_{oc}$ de 3,9).

- Enfin, des facteurs de bioconcentration (entre poissons et eau contaminée) ont été publiés par PPDB (Pesticide Properties Data Base) (BCF de 2896), ce qui indique que l'aclonifen sera préférentiellement stocké dans les membranes biologiques, les réserves huileuses ou graisseuses des organismes rencontrés.

3) Utilisation de l'aclonifen :

Du point de vue des applications le Pesticide Manual (Tomlin, 2006) indique que la cible biochimique de l'aclonifen concerne la voie de biosynthèse des caroténoïdes sans avoir de précision sur l'enzyme cible atteinte. Le mode d'action est dit systémique sans autre précision. L'utilisation est décrite comme possible sur blé d'hiver, pomme de terre, tournesol et pois, mais aussi carottes, maïs et autres cultures. Diverses formulations avec le seul aclonifen comme matière active sont disponibles. Il existe ainsi des spécialités avec des mélanges de matières actives (exemple en France : aclonifen + aminotriazole en suspension concentrée sur vigne, formulation Derby de Nufram).

Quelle est la mise en œuvre agronomique de l'aclonifen ?

Comme tous les pesticides, l'aclonifen est utilisé en agriculture sous forme formulée grâce à divers adjuvants dont la composition et les proportions sont protégées par un brevet. Mais qui correspondent toutes à des suspensions concentrées. A travers le monde l'aclonifen formulé se présente sous différents noms commerciaux : Bandur (aclonifen seul), Carioca (aclonifen + oxadiargyl), Challenge (aclonifen seul), Fenix (aclonifen seul), Nikeyl (aclonifen + flurtamone), Lagon (aclonifen + isoxaflutole) ou encore Prodigio (aclonifen seul). (www.compendium.bayercropscience.com; www.cetiom.fr; Brendstrup et Kloster, 1998). Toutes ces formulations sont des suspensions concentrées (SC) adaptées à des traitements de prélevée, c'est-à-dire que la matière active se trouve répandue sur le sol juste après le semis mais avant germination de la culture, mais aussi des adventices. Une telle formulation est faite pour se maintenir dans les premiers cm de sol. Pour cela, il faut que la

matière active ne soit pas trop entraînable par l'eau, ne soit pas trop vite dégradée par la lumière ou la microflore du sol.

Avec ce type de traitement dit de prélevée, la plante à détruire ne peut absorber la matière active ainsi apportée que par le biais du sol et de l'eau du sol en contact avec les parties souterraines au niveau de la zone contaminée. Si cette opération est réussie et que, grâce au mouvement de la sève brute (système xylémienne) il existe un chargement de la feuille en aclonifen, les symptômes de toxicité peuvent apparaître. Si la concentration foliaire est suffisante et si la plante traitée n'est pas résistante à cet herbicide.

Quelles sont, au niveau mondial, les différentes cultures qui sont capables d'échapper à l'effet aclonifen ?

Les grandes cultures les plus citées comme capables de supporter la présence d'aclonifen sont le tournesol (Millet, 1992a ; Zech, 1993 ; Chollet et al., 1998 ; Pannaci et al., 2007), le maïs (Laverrière et Zech, 1992 ; Trevisan et al., 1999), la pomme de terre (Millet, 1992b et 1992c ; Lardier, 1991), le pois protéagineux (Cabanne et al., 1992), le pois chiche et la lentille (Millet, 1992d). L'aclonifen a trouvé aussi son emploi en maraîchage sur ail, échalote, carotte, persil, oignon. L'utilisation sur plantes aromatiques et médicinales est, dans certains cas, autorisée.

Le succès commercial de l'aclonifen au niveau Européen et mondial n'a rien à voir avec celui qu'a connu l'atrazine, par exemple qui était un herbicide employé dans de très grandes cultures (maïs, canne à sucre) à l'échelle mondiale (100 000 t/an dans le monde avec 5000 t/an uniquement en France, jusqu'à l'interdiction de vente prise en 2003, (Tissut et al., 2006). Cependant, le retrait du marché d'un certain nombre de produits dans les années récentes, en Europe, spécialement 2008, pourrait laisser à l'aclonifen une place plus importante sur le marché des herbicides en particulier en Europe et sur le continent sud Amérique. (www.compendium.bayercropscience.com/BAYER/CropScience).

Quels sont les pays utilisateurs d'aclonifen et quelles sont les autorisations françaises?

Essentiellement utilisé en Europe [1000 tonnes en 1996 (Trevisan et al., 1999), 7500 tonnes en 2007 EFSA (European Food Safety Authority)], l'aclonifen est particulièrement utilisé en France, en Italie (Pannacci et al., 2007), en Espagne en Allemagne, au Danemark, en Suède, en Finlande, en Norvège, aux Pays Bas, en Suisse, en Autriche et en Belgique. Aux portes de l'Europe, la Turquie qui s'adapte à une agriculture moderne est utilisatrice d'aclonifen. (Zengin, 1999 ; Lopez et Royo, 2001 ; Sanli et al., 2009), Le continent sud-américain avec l'Argentine, le Chili et le Brésil, est lui-aussi utilisateur de l'aclonifen. L'Amérique de Nord et le continent asiatique ne semblent pas concernés par l'utilisation de cet herbicide.

En France (Index ACTA, 2010) deux spécialités commerciales avec l'aclonifen comme unique matière active sont autorisées : le Challenge 600 (600 g de matière active par litre) généralement autorisé à 2,7 kg/ha. et le Chalban (même dosages).

Certains mélanges de matières actives sont autorisés : aclonifen + aminotriazole sur vigne, avec la spécialité Derby de Nufram. Enfin, les spécialités à base d'aclonifen et de flurtamone réalisées avec les mêmes quantités de matières actives, sont vendues par Bayer CropScience sous les noms commerciaux de Cline et Nikeyl.

4) Devenir environnemental de l'aclonifen :

Le devenir environnemental des xénobiotiques déversés volontairement dans l'environnement est une question récurrente de notre Société depuis un certain nombre d'années. En particulier, les pesticides sont montrés du doigt chaque fois que des traces de telle ou telle molécule sont retrouvées dans l'eau, les sols, les sédiments, l'atmosphère, les aliments. Les pesticides dans leur globalité font l'objet de décisions politiques françaises importantes au sein du Grenelle de l'Environnement (I et II). Face à ces questionnements légitimes la loi conduisant à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'une nouvelle molécule ou d'une nouvelle formulation s'est très fortement durcie durant les 30 dernières années. Cette loi oblige, entre autre, les fabricants à réaliser de nombreux tests toxicologiques et écotoxicologiques dont les résultats doivent apparaître dans le dossier d'homologation. Malgré la pertinence et l'intérêt de tels tests ceux-ci ne seront jamais à même de traduire toutes les situations environnementales ou de physiologie humaine. Quelques références bibliographiques concernant le comportement environnemental et toxicologique de l'aclonifen.

La **dégradation dans le sol** est un élément clé de la dissipation d'un pesticide dans l'environnement. La moyenne des valeurs mesurées en aérobiose au champ ou en laboratoire se situe pour la DT50 (disparition de 50% de la dose) dans une fourchette allant de 30 à 94 jours. Compte tenu de la diversité des sols cette DT50 peut varier de 13 à 195 jours tandis que la DT90 oscille entre 104 et 649 jours (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/15.htm>)

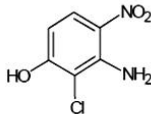
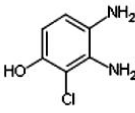
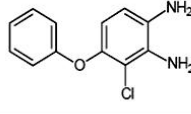
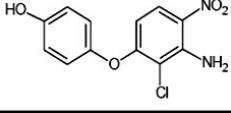
La **photolyse dans l'eau** ne semble pas une voie majeure de dégradation, la DT50 mesurée dans les conditions standard est de 197 jours. Dans la nature, cette valeur est très dépendante de la saison, la fourchette des valeurs de demi-vie oscille entre 9 et 1040 jours.

L'indice GUS jugeant de l'entraînement par l'eau est dépendant de la demi-vie et du log P. Avec un GUS de 0,30, l'aclonifen se classe dans les matières actives à lixiviation faible. Ce paramètre peut être mis en parallèle avec **le Koc ou constante de sorption normalisée au**

taux de carbone d'un substrat. Ce Koc est dans une fourchette de 5320 à 10610 ml/g ce qui indique une molécule non mobile dans les sols.

5) Métabolites trouvés dans les plantes (sans spécification) :

La culture traitée est la première concernée pour l'accumulation des herbicides appliqués pour la simple est bonne raison que cette culture reste vivante et progresse en masse tandis que les adventices sont tuées à l'état de plantules insignifiantes du point de vue biomasse. Il est alors logique que le législateur se soit intéressé au devenir de la ou des matières actives dans les plantes cultivées. Sur ce point nos informations sont rudimentaires : elles comportent 4 structures (fournies comme témoins par Bayer CropScience):

RPA 508285	3-amino-2-chloro-4-nitrophenol	
RPA 407288	3,4-diamino-2-chlorophenol	
RPA 407291	3-chloro-4-phenoxybenzene-1,2-diamine	
RPA 407074	4-(3-amino-2-chloro-4-nitrophenoxy)phenol	

Nous n'avons pas trouvé d'indication portant sur l'inefficacité comme herbicide de ces 4 métabolites (2 d'entre eux ne sont plus des diphenyléthers mais des phénols chlorés potentiellement découplants protonophores des systèmes membranaires).

Les données relevant de l'**éco-toxicologie** sont nombreuses et concernent diverses espèces animales ou végétales Le premier élément d'analyse concerne le facteur de bioconcentration (BCF = 2896) ce qui est une valeur élevée, et classe l'aclonifen au seuil de préoccupation. Compte tenu de la valeur de logP, ce facteur de bioconcentration n'est pas surprenant. Les principaux résultats écotoxicologiques récoltés sont les suivants :

*Poissons Toxicité aiguë à 96h LC50 0,67 mg/l *Oncorhynchus mykiss* (**Toxicité modérée**).

*Poissons Toxicité chronique NOEC 21j 0,005 *Pimephales promelas* (**Toxicité nulle**).

*Invertébrés aquatiques Toxicité aiguë 48h EC50 1,2 mg/l *Daphnia magna* (**Toxicité nulle**).

*Invertébrés aquatiques Toxicité chronique NOEC 21j *Daphnia magna* (**Toxicité nulle**).

*Organismes/sédiments Toxicité chronique à 28j NOEC *Chironomus riparius* (**Toxicité modérée**).

*Plantes aquatiques Toxicité aiguë 7J EC50 biomasse 0,006 mg/l *Lemna gibba* (**Toxicité élevée**).

*Algues Toxicité aiguë 72h EC50 croissance 0,47 mg/l *Navicula pelliculosa* (**Toxicité modérée**).

*Abeilles Toxicité aiguë 48h LD50 >100 µg/abeille (**Toxicité modérée**)

*Lombrics toxicité aiguë 14 j LC50 150 mg/kg *Eisenia foetida* Toxicité (**modérée**)

*Lombrics toxicité chronique 14 j NOEC reproduction 45 mg/kg *Eisenia foetida* (**Toxicité modérée**)

*Pas d'effets découverts sur les micro-organismes des sols (cycles du carbone et de l'azote).

Pour l'Europe, le classement toxicologique de l'aclonifen est « **dangereux pour l'environnement** » en raison des phrases de risque R50 et R53 définies ainsi : « Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme dans l'environnement aquatique ». Ces phrases de risques sont associées à des conseils de prudence (phrases S60 et 61) à savoir : S60 « Eliminer le produit et son récipient comme un produit dangereux. », et, S61 « Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales, la fiche de donnée de sécurité. »

Concernant les risques pour la **santé humaine** un certain nombre de tests sont nécessairement réalisés pour le dossier d'homologation. Quelques résultats trouvés dans la littérature sont reportés ci-dessous.

- Mammifères Toxicité aiguë par voie orale LD50 > 5000 mg/kg Rat : toxicité faible
- Mammifères Derme LD50 > 5000 mg/kg Rat : non toxique

Classement toxicologique (OMS) : peu susceptible de donner lieu à un risque aigu dans les conditions normales d'utilisation.

- Dose journalière admissible (DJA) : 0,07 mg/kg (rat)
- Niveau d'exposition acceptable pour l'opérateur (NEAO) : 0,07 mg/kg (rat)

Risque très faible de contamination de la nourriture, risques mineurs d'exposition par manipulation, le risque majeur étant un contact avec l'épiderme.

Nous n'avons pas trouvé de données sur la carcinogenèse, sur les mécanismes endocriniens, sur la reproduction et les effets sur le développement. L'aclonifen ne cause pas de problème sur l'acétylcholine estérase, ce n'est pas un neurotoxique, il n'est pas

irritant du tractus respiratoire, n'irrite pas les yeux. Par contre, l'aclonifen est irritant pour la peau.

D) La thématique scientifique abordée avec nos partenaires.

Avec nos partenaires de Bayer CropScience Lyon (Laurent Perez, Christian Lasselin, Franck Ledoux, Géraldine Emerice, Renaud Grasset et Bernard Couloume) nous avons engagé lors d'un stage du Master 2 Recherche « Méthodes de Recherche en Environnement et Santé » puis lors d'un doctorat dont vous avez ici le manuscrit, une étude sur la caractéristiques herbicides de l'aclonifen, d'une point de vue biochimique, physiologique, agronomique et écologique qui a débouché sur la description du mode d'action qui n'était pas clairement élucidé au début de notre travail. Sur le plan agronomique nous avons cherché à étudier, en différentes conditions la marge de sélectivité entre la culture de colza et ses principaux adventices. Dégager une marge de sélectivité sur une culture de première importance aussi intéressante du point de vue alimentaire que du point de vue biocarburant peut se révéler stratégique au niveau des intérêts d'une firme phytosanitaire. Enfin, nous avons cherché à comprendre pourquoi certaines cultures acceptent l'aclonifen aussi bien en prélevée qu'en postlevée. C'est pourquoi nous avons été conduit à expérimenter sur la résistance du tournesol et du maïs cultivé en présence d'aclonifen utilisé aux doses agronomiques autorisées en France.

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre sera réduit au minimum pour la simple raison que nous avons choisi, dans un souci qui nous semble de clarté, de présenter dans chaque chapitre abordé une partie matériel et méthodes adaptée au chapitre concerné. On notera qu'une telle démarche devrait permettre une lecture plus facile tant les chapitres sont divers dans leur démarche et dans leurs techniques d'approche. Nous nous contenterons ici de décrire rapidement d'une part les plantes mises en œuvre et nos moyens de culture et d'autre part de donner les références des différents appareillages utilisés. Ce chapitre se terminera par ce qui pourrait être une rubrique de résultats c'est-à-dire l'établissement d'un des paramètres physico-chimiques essentiels descripteur de l'aclonifen : sa partition entre l'octanol et l'eau ($\log P$ ou $\log K_{ow}$) par une méthode classiquement mise en œuvre depuis des années au laboratoire

A) Plantes utilisées et modes de culture :

Nous avons utilisé un certain nombre de plantes cultivées et d'adventices. Certaines espèces ont beaucoup été utilisées d'autre de manière plus anecdotique. Parmi les semences de plantes cultivées ont été utilisées : le blé (*Triticum aestivum*), le maïs (*Zea mais*), le tournesol (*Helianthus annus*), le colza (*Brassica napus*) et plus rarement, la luzerne (*Medicago sativa*), la laitue (*Lactuca sativa*), la carotte (*Daucus carotta*), le radis (*Raphanus sativum*) et le concombre (*Cucumber sativus*). Ces semences proviennent d'une jardinerie pour jardiniers amateurs.

Les semences d'adventices utilisées dans ce travail proviennent pour la plupart de Bayer CropScience (merci Christian Lasselin). Quelques semences ont été récoltées sur le terrain expérimental proche du laboratoire (morelle noire et moutarde sauvage). Enfin, quelques plantes sont venues « spontanément » avec la terre franche utilisée pour la préparation de divers substrats de culture. Ainsi, les adventices utilisés (peu ou beaucoup) sont : le vulpin (*Alopecurus pratensis*), la moutarde blanche (*Sinapis alba*), la moutarde sauvage (*Sinapis pratensis*), l'oxalis (*Oxalis cornicula*), le lamier pourpre (*Lamiuym purpureum*), la morelle noire (*Solanum nigrum*) et enfin, un individu unique de prêle (probablement *Equisetum arvense*).

Suivant les expérimentations et la durée souhaitée de la culture, les techniques mises en œuvre pour obtenir des plantules plus ou moins développées ont été les suivantes :

- Culture en boîte de Pétri sur une couche de papier humide placé au fond de la boîte. Cette culture sans substrat nutritif autre que les réserves cotylédonaire ne dépasse pas une

semaine. En général la culture se déroule dans un phytotron de petite taille (Phytotron CLF Plant Climatics MP-450).

- Culture en salle conditionnée généralement réglée à la température de 18°C la nuit (8h) et 24 °C le jour (16h). L'H.R. est voisine de 80%. Dans ces conditions, le colza qui a beaucoup été utilisé n'a pas une croissance satisfaisante (cultivé autrement). La chambre conditionnée utilisée permet plusieurs m² de cultures généralement en pots.
- Culture dans la serre (vétuste) du laboratoire. Cet espace éclairé pour l'essentiel par la lumière du jour n'est pas climatisée. Son avantage principal c'est la place et la possibilité de faire « un petit jardin de plusieurs m de long avec une profondeur de sol d'une 30aine de cm. Dans cet espace nous avons trouvé des conditions presque naturelles pour la culture du colza.

B) Les substrats des cultures :

Nous venons de voir que sur boîte de Pétri le seul substrat c'est l'eau qui ne permet pas de longues cultures.

Pour des raisons qui apparaîtront au fil des chapitres nous avons utilisé massivement 3 types de substrats de culture (pots et bacs) ayant des caractéristiques différentes en particulier vis-à-vis de la rétention de l'aclonifen. Le plus simple de ces substrats est représenté par le **sable** de rivière dont nous avons vérifié les teneurs nulles en C et N. Un deuxième substrat est constitué à part égale de **sable et de terre franche** venant de notre terrain expérimental. Enfin, le 3^{ème} substrat, le plus riche en matière organique est composé de **sable, de terre franche et de terreau** dans les proportions (4/4/1 : v/v/v). Le terreau utilisé (Klasmann substrat 3) a un pH de 6, sa teneur en C est de 40% et sa teneur en N de 0,8%. Dans tous les cas de substrats ceux-ci sont tamisés à 2 mm.

C) Les appareils de mesure utilisés :

Nous avons été amené lors de différentes étapes de récupération de l'aclonifen dans les plantes ou les substrats sols à effectuer différentes **centrifugations** à basses et moyennes vitesses (Jouan KR22 et Jouan CR 22). Pour quelques extractions de fractions microsomaux nous avons utilisé une ultracentrifugeuse (Bekman L8-70M Ultracentrifuge, 100 000 g).

La **réémission de fluorescence** des protoporphyrines IX a été analysée grâce à un spectrofluorimètre SAFAS (Xenius) d'après la technique de Hukmani and Tripathy (1992).

L'analyse quantitative des échantillons radioactifs est effectuée généralement par scintillation liquide (Wallac Winspectral 1414 Liquid Scintillation counter). Les mélanges scintillants utilisés ici ont été : Rotiszint ecoPlus de chez Roth pour les échantillons habituels à base d'eau ou de solvants organiques et parfois le mélange de Perkin Elmer : Ultima Gold AB

pour les échantillons très acides (issus de la minéralisation d'échantillons en présence d'acide perchlorique). Cette radioactivité peut être aussi évaluée grâce au Perkin Elmer Optiquant CycloneTM storage Phosphor System. Cet appareil, grâce à des plaques impressionnables en présence de radioactivité permet des « autoradiographies » montrant par exemple la position de l'élément radioactif dans une feuille, sur un chromatogramme.... Ces plaques ont comme référence Perkin Elmer (Downers Grove, IL 60515 Type SR (125,5 X 25.2 cm).

D'autres appareils ont été utilisés de manière un peu moins routinière :

Le Lyophilisateur Crist Alpha 1-2 LD afin de réduire et de conserver avant analyse certains extraits d'échantillons de plantes ou de sols, un lecteur de microplaques 96 puits, Thermoscientific Varioskan[®] Flash, un spectrophotomètre Amersham Biosciences Ultraspec 3100-pro, un évaporateur rotatif Rotavapor Buchi 011 Julabo FE 500 réfrigérateur Bioblock Scientific.

D) Détermination pratique du logP de l'aclonifen :

L'histoire scientifique de l'équipe dans laquelle s'est déroulé ce travail a toujours démontré le rôle majeur joué par la lipophilie des molécules étudiées dans leur devenir au niveau des cibles biochimiques visées, au niveau comportement cellulaire, tissulaire et au niveau des transferts à petites et grandes distances. De même le devenir dans l'environnement de molécules aussi emblématiques que le DDT trouve largement son explication dans la valeur de ce paramètre physico-chimique qu'il est souhaitable de déterminer avec le plus grand soin. Cette précaution est de règle au laboratoire quand une nouvelle molécule entre dans nos murs. L'aclonifen n'a pas échappé à la règle.

Compte tenu de la structure diphenyléther de l'aclonifen et de sa faible solubilité dans l'eau, on pouvait supposer que la partition de cette molécule serait déterminante non seulement pour sa distribution eau/plante mais aussi dans sa distribution vers le complexe argilo-humique voir les autres organismes vivants de ce complexe (microflore, microfaune). C'est pourquoi nous avons réalisé des études quantitatives de partition tout d'abord avec le solvant lipophile qui sert de référence (le *n*-octanol) menant à l'expression classique du logP (logK_{ow} des anglo-saxons). Dans d'autres expériences l'octanol a été remplacé par deux huiles extraites l'une du colza et l'autre de maïs, huiles mimant les espaces lipophiles des espaces cellulaires.

1) Mesure du coefficient de partition octanol/eau pour l'aclonifen

10 ml d'eau sont mis dans un tube à centrifuger en verre à col large. 1 ml de *n*-octanol est déposé en surface. L'aclonifen est ajouté à partir de solutions mères éthanoliques concentrées. Trois concentrations sont soumises à expérimentations : apport de 5 nmoles (uniquement

radioactif : soit 500000 dpm), 1 μ mole (aclonifen froid + 500000 dpm radioactif), et enfin, 10 μ moles (aclonifen froid + 500000 dpm radioactif). Les solutions ainsi préparées sont mises sous agitation (100 rpm) pendant 3 temps : 3, 48 et 72h. A la fin du temps d'agitation, une pipette de verre est plongée au fond du tube pour récupérer 1 ml de solution aqueuse. Ce ml est mis dans un pot de comptage après avoir pris la précaution d'essuyer avec attention l'extérieur de la pipette (traces d'octanol). Le ml d'octanol est prélevée avec une deuxième pipette de verre. On laisse un temps de décantation dans la pipette avant d'éliminer les éventuelles gouttes d'eau (biphase très visible). L'octanol débarrassé de la fraction aqueuse éventuelle est déposé dans un flacon pour mesure de radioactivité. Le calcul de partition correspond au rapport entre la concentration dans l'octanol et celle dans l'eau, corrigé du rapport des volumes. Les valeurs de logP obtenues dans les différentes conditions expérimentales sont rassemblées dans le tableau ci-dessous :

Valeurs mesurées du logP de l'aclonifen lors d'un partage *n*-octanol/eau. Ce tableau présente les valeurs obtenues pour trois quantités d'herbicide (5 nmoles, 1 μ mole et 10 μ moles) ainsi que pour 3 temps d'expérimentation (3h, 48 h et 72 h). Les valeurs exprimées sont la moyenne de 4 répétitions.

quantités d'herbicide	3 h	48 h	72 h
5 nmoles	3,33 \pm 0,03	3,41 \pm 0,04	3,38 \pm 0,01
1 μ mole	3,34 \pm 0,04	3,50 \pm 0,04	3,87 \pm 0,03
10 μ moles	3,26 \pm 0,02	3,66 \pm 0,03	3,84 \pm 0,05

Les valeurs obtenues sont relativement homogènes (comprises entre 3,3 et 3,87), les valeurs les plus faibles correspondent aux temps les plus courts d'exposition des deux phases non miscibles. Le mouvement d'agitation des deux phases est relativement lent pour éviter les débordements, la rétention de l'octanol sur les bords du tube, l'émulsion. On peut supposer que, pour ces raisons, à 3h l'équilibre de partition ne soit pas encore complètement atteint.

Choisissant les valeurs du plus grand temps d'exposition comme celui où les chances d'équilibre entre les deux solvants sont les mieux réunies nous obtenons un **logP de 3,7** (moyenne des 3 valeurs mesurées à 72 h). Cela donne une valeur de partition de 5000 dans l'octanol pour 1 dans l'eau, ce qui est la caractéristique d'une molécule à caractère lipophile très marqué. Cependant notre valeur déterminée grâce à des dosages radioactifs n'est pas au niveau de celle trouvée dans le dossier d'homologation (= 4,37). La littérature nous fournit d'autres valeurs voisines : 3,98 (Trevisan et al., 1999) ; 4,04 (Nandihalli et al., 1993) et 3,14 (Ruelle, 2000). Ce paramètre ayant une telle importance pour établir la biodisponibilité, la

bioconcentration, l'efficacité physiologique qu'il semble nécessaire de prendre toutes les précautions dans l'établissement de cette valeur.

2) Mesure du coefficient de partition huile/eau pour l'aclonifen :

Dans des conditions expérimentales identiques aux précédentes, nous avons mesuré le coefficient de partition P' entre l'eau et les huiles de maïs et de colza. Composées d'acides gras ces huiles ne ressemblent pas chimiquement au *n*-octanol mais s'en rapprochent du point de vue lipophilie. Pour chaque huile un seul temps d'équilibre (48 h) et une seule quantité d'aclonifen (5 nmoles avec le produit radioactif) ont été expérimentés. Chaque essai a été répliqué 5 fois. Les résultats sont les suivants : **$\log P = 3,45 \pm 0,06$ pour l'huile de tournesol et $\log P = 3,41 \pm 0,06$ pour l'huile de colza.** Ces valeurs très proches l'une de l'autre (P de l'ordre de 3000) sont assez largement comparables à la valeur trouvée avec les solvants classiquement utilisés pour mesurer ce paramètre .

CHAPITRE I : SYMPTOMATOLOGIE LIEE A L'EFFET HERBICIDE DE L'ACLONIFEN.

Dans l'étude des grands groupes d'herbicides, les travaux physiologiques référencés montrent constamment que c'est un seul mode d'action biochimique majeur qui contrôle l'efficacité phytotoxique malgré l'existence possible d'effets sur d'autres cibles biochimiques. Ces effets secondaires s'expriment en général à des concentrations plus fortes que celles inhibant la cible primaire. Dans les années 70, Moreland et Huber (1979) défendaient l'idée que certaines familles chimiques au comportement mal connu agissaient par dysfonctionnement global des systèmes membranaires (modification de la fluidité membranaire par les carbamates ou les nitroanilines, par exemple) entraînant ainsi un effet herbicide généralisé sans cible biochimique précise. Cette théorie qui pouvait paraître séduisante, n'a pas résisté à l'expérimentation (Tissut *et al.*, 2006).

Au sein de la famille chimique des diphényléthers (DPE), de nombreux dérivés de synthèse ont eu ou ont encore un destin agronomique et commercial comme herbicides. Leur action physiologique constante dans le végétal est la destruction photo-dépendante (Graham, 2005) des membranes biologiques résultant d'une inhibition enzymatique dans la voie de biosynthèse des cytochromes et chlorophylles (Jacobs *et al.*, 1991 ; Hess, 2000). Ce blocage porté par les DPE dits vrais conduit à l'apparition photodépendante (Lydon and Duke, 1988; Matringe and Scalla, 1988; Sandman and Böger, 1988; Witkowski and Halling, 1988 et 1989 ; Krijt *et al.*, 1992), de nécroses foliaires d'autant plus importantes que le flux de lumière est puissant. L'aclonifen, appartenant chimiquement aux DPE, présente des symptômes de toxicité sur adventices qui laissent fortement supposer que son mode d'action n'est pas classique pour un diphényléter (figure I, 1). Nous présentons, dans cette première partie, nos résultats sur la symptomatologie liée à l'emploi de cet herbicide mal connu et peu étudié malgré une découverte qui remonte à 1977.

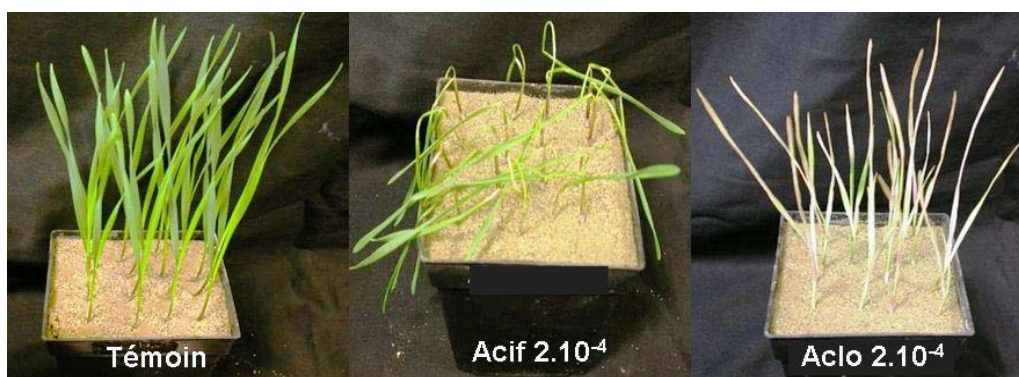


Figure I, 1 : Illustration de symptômes particuliers obtenus après traitement racinaire avec l'herbicide de la famille chimique des diphényl'éthers (DPE) : l'aclonifen en comparaison avec un DPE classique : l'acifluorfen. Cultures sur sable de plantules de blé de 15 jours. Témoin à gauche, acifluorfen [$2 \cdot 10^{-4}$ M] au centre, et aclonifen [$2 \cdot 10^{-4}$ M] à droite. Le symptôme premier classique lié aux DPE correspond à l'apparition, à la lumière, de zones nécrotiques dans le 1/3 inférieur des feuilles. Ces nécroses ne sont pas visibles sur les plantes traitées à l'aclonifen alors qu'une dépigmentation des limbes est très visible.

A- Matériels et méthodes :

1) Plantes utilisées :

Des plantules de semences cultivées [blé (*Triticum aestivum*), maïs (*Zea mays*), tournesol (*Helianthus annuus*), colza (*Brassica napus*)... et pour une petite part aussi laitue (*Lactuca sativa*), luzerne (*Medicago sativa*), radis (*Raphanus sativus*), carotte (*Daucus sativus*)] âgées de 10 à 30 jours ont été utilisées dans cette étude. Quelques essais ont aussi concerné des « mauvaises herbes », ce fut le cas du vulpin (*Alopecurus myosuroides*), des moutardes blanche et sauvage (*Sinapis alba* et *arvensis*), de la morelle noire (*Solanum nigrum*), de l'oxalis (*Oxalis corniculata*), du lamier (*Lamium purpureum*) et du chiendent (*Agropyrum repens*). Les semences au repos sont rapidement lavées à l'eau de Javel (0,2%) puis rincées plusieurs fois à l'eau du robinet avant d'être mises une nuit durant, en phase d'imbibition dans une boîte de Pétri préalablement humidifiée. Les semences réhydratées sont ensuite semées sur sable soigneusement lavé ou parfois sur d'autres substrats plus complexes (mélanges terre franche/terreau/sable en proportions variables après tamisage à 2 mm). Les cultures sont souvent conduites dans des pots à section carrée (10 cm/10 cm contenant environ 650 g de substrat-sable), en plastique noir. Suivant la taille des semences, le nombre d'individus par pot est variable. A titre d'exemple avec le blé, la culture par pot est de 16 individus mais uniquement de 6 avec le maïs. Les cultures sont réalisées en chambre phytotronique (température 24°C/18°C jour/nuit, HR 80%). La photopériode est de 16h/jour, l'intensité lumineuse incidente (PAR : Photosynthetically Active Radiations) est de l'ordre de 150-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (rampe d'éclairage située à environ 1 m de la culture). Après germination, les

jeunes organismes sont cultivés sur des périodes généralement comprises entre 10 et 30 jours (parfois plus pour les adventices plus lentes à se développer). Pour des durées de culture inférieures à 10 jours nous avons parfois opté pour des cultures sans substrat, directement sur papier filtre hydraté installé au fond d'une boîte de Pétri maintenue fermée.

2) Herbicides utilisés :

L'aclonifen utilisé provient de la formulation Challenge 600 après extraction et purification par nos soins (voir résultats). L'acifluorfen (DPE classiquement utilisé comme référence d'inhibition de la synthèse des chlorophylles) et le norflurazon (inhibiteur de référence agissant sur la voie de synthèse des caroténoïdes) proviennent des Etablissements Cluzeau (Sainte Foy La Grande). Les solutions mères utilisées pour préparer les phases aqueuses de traitement sont généralement des solutions éthanoliques (plus rarement des solutions dans le diméthylsulfoxyde : DMSO). Nous avons vérifié que ces solutions restent stables chimiquement au cours d'une conservation prolongée à l'obscurité et au froid (4 °C).

3) Traitement des plantes par les herbicides étudiés :

Les semences au repos (déshydratées) sont d'une très grande résistance aux composés organiques toxiques pour la simple raison que de telles semences n'échangent pas avec leur milieu environnant. Par contre, une semence qui démarre sa germination devient un organisme vivant d'une très grande vulnérabilité. C'est pour cette raison que, dans la pratique agricole de lutte contre les « mauvaises herbes » des cultures, les traitements herbicides de plein champ s'adressent souvent à des plantules (traitements de pré-levée par dépôt sur ou dans le sol de la matière active formulée). Dans la plupart de nos expérimentations, les traitements ont été apportés au « sol » grâce à des phases aqueuses titrées faites à partir de solutions mères d'herbicides solubilisés dans l'éthanol. La formulation commerciale de l'aclonifen (Challenge 600) étant une suspension concentrée (SC) destinée à un traitement de pré-levée, l'essentiel des traitements que nous avons effectués correspond à des traitements mimant les traitements au champ. Des essais de traitements foliaires, dont les résultats seront présentés plus loin, seront alors justifiés par rapport à une stratégie scientifique bien précise qui sera expliquée à cette occasion.

4) Détection de la matière active et des pigments photosynthétiques : dosages.

4a) Extraction des pigments foliaires : Des feuilles fraîches sont rapidement prélevées et pesées. Elles sont immergées dans une petite quantité d'acétone (10 ml), broyées au mortier en présence de sable de Fontainebleau (1g). L'opération est renouvelée 3 fois jusqu'à

décoloration totale des parties insolubles. Les fractions acétoniques réunies sont concentrées sous vide grâce à un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par un volume précis d'acétone/H₂O, (4/1 : v/v).

4b) Dosage des chlorophylles et caroténoïdes : La solution précédemment préparée est dosée par spectrophotométrie (Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro) grâce à des données spectrales enregistrées entre 400 et 700 nm. Le calcul des concentrations en chlorophylles totales (chl.tot), chlorophylle a (chl a), chlorophylle b (chl b), caroténoïdes (car) s'effectue en appliquant diverses équations établies par Arnon (1949) et revues par Lichtenthaler (1987) et Porra (2002). Ces équations données pour un solvant acétone/H₂O, (4/1 : v/v), prennent en compte les densités optiques (DO) pour certaines longueurs d'ondes spécifiques des pigments photosynthétiques (470, 647 et 663) :

- chlorophylle a ($\mu\text{g/ml}$) = $12,25.\text{DO}_{663} - 2,79.\text{DO}_{647}$
- chlorophylle b ($\mu\text{g/ml}$) = $21,5.\text{DO}_{647} - 5,10.\text{DO}_{663}$
- chlorophylles totales ($\mu\text{g/ml}$) = $7,15.\text{DO}_{663} + 18,71.\text{DO}_{647}$
- caroténoïdes ($\mu\text{g/ml}$) = $(1000.\text{DO}_{470} - 1,82.\text{chl a} - 85,02.\text{chl b})/198$

4c) Séparation des pigments : Les pigments photosynthétiques sont séparés par chromatographie sur couches minces de silice (Macherey-Nagel, SiO₂ F₂₅₄) avec le solvant suivant : éther de pétrole (40-60°C)/dichloroéthane/acétone (3/1/1 : v/v/v). L'ordre de migration des produits majoritaires en partant du front de migration est : le β carotène, les chlorophylles a puis b, la lutéine, la violaxanthine, la néoxanthine. La quantification de chacun de ces pigments peut être réalisée grâce à l'utilisation d'un lecteur de plaque travaillant longueur d'onde par longueur d'onde (Chromoscan 460).

B- Résultats :

1) Mise au point des outils analytiques d'étude de l'aclonifen : extraction-dosage :

La matière active d'aclonifen a été obtenue par extraction et purification à partir de la formulation homologuée Challenge 600 commercialisée par notre partenaire dans cette étude (Bayer CropScience). Il s'agit d'une suspension concentrée (SC) dosée à 600 g de matière active par litre de produit commercial. Lors de cette opération d'extraction et de purification, notre objectif a été de se familiariser avec la molécule et d'obtenir des quantités suffisantes d'aclonifen propre pour toute la durée de notre travail.

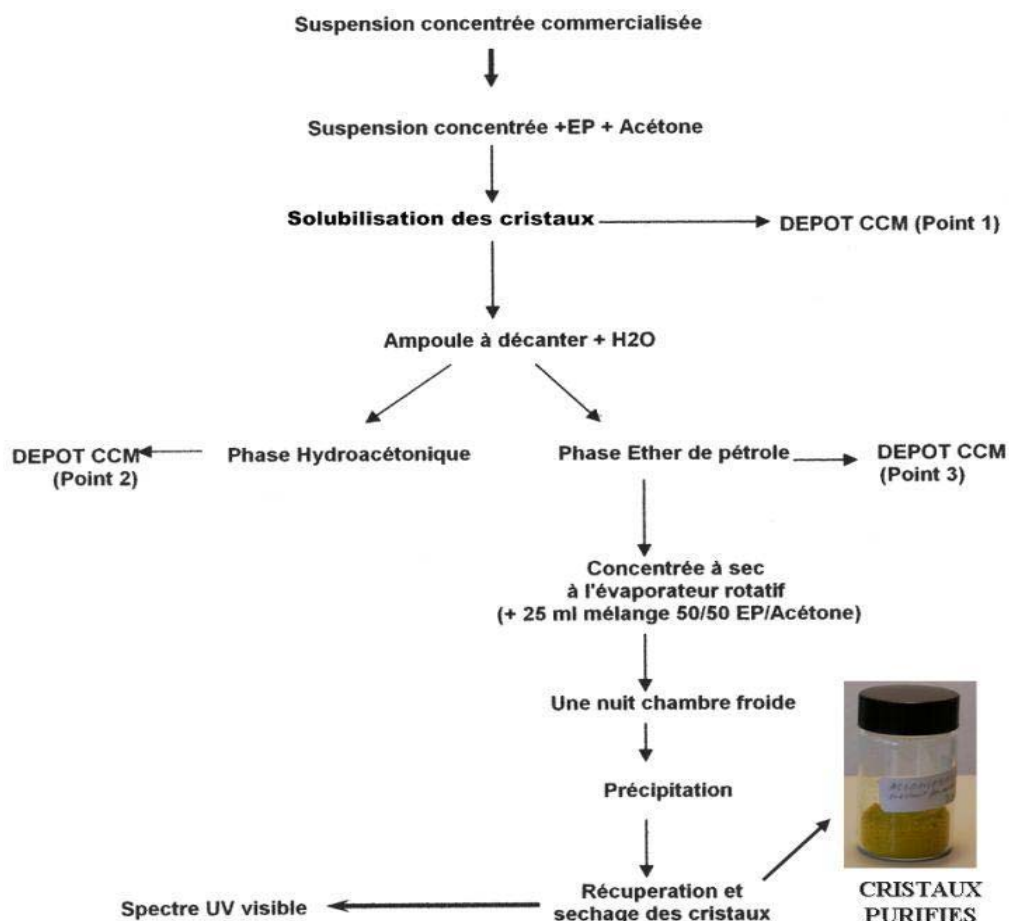


Figure I, 2 : Schéma d'extraction mis en œuvre pour obtenir, à partir du produit formulé, l'aclonifen. EP = éther de pétrole (40-60°C). Les mentions « DEPOT CCM » font référence aux dépôts du chromatogramme présenté figure I, 3.

A partir du produit commercial nous avons mis au point un système d'extraction par partage liquide/liquide en ampoule à décanter. Le schéma d'extraction que nous avons réalisé est présenté figure I, 2. Sur le principe, il s'agit de solubiliser une partie aliquote (10 ml) de SC commerciale, de diluer cette quantité par de l'acétone. Ce dernier solvant dans lequel l'aclonifen est bien soluble, garantit la solubilisation totale des cristaux de matière active présents sous cette forme dans la SC. La solution acétonique ainsi préparée est partagée dans une ampoule à décanter contre de l'éther de pétrole (40-60°C). L'ajout d'une petite quantité d'eau distillée facilite l'obtention d'un biphasé entre une phase hydro-acétonique dont la polarité a énormément augmenté grâce à l'apport d'eau et une phase moins dense acétonico-éthéro-pétrolique. Du fait de sa faible solubilité dans l'eau, l'aclonifen sera très préférentiellement concentré dans la phase supérieure contenant l'éther de pétrole. Cette phase récupérée est rapidement rincée à l'eau distillée, concentrée à sec à l'évaporateur rotatif à température modérée (30°C). Nous avons alors obtenu, grâce à une cristallisation au froid

(solution concentrée mise une nuit au réfrigérateur), de beaux cristaux de couleur jaune-orangée. Sans chercher un rendement maximal nous avons obtenu à partir de la prise d'essai de 10 ml de Challenge 600 environ 4 g de cristaux propres chromatographiquement et spectrophotométriquement.

2) Mise au point d'un système chromatographique permettant la mise en évidence de l'aclonifen :

Nous avons cherché un système chromatographique sur plaque susceptible de mettre en évidence cette matière active. Parmi les différents supports à notre disposition (silice, silice C18, cellulose, polyamide, alumine ...), c'est le support silice (Macherey-Nagel SiO₂ F₂₅₄) qui s'est révélé le plus approprié. Notre choix de la phase mobile s'est logiquement orienté vers des solvants lipophiles et, après un certain nombre d'essais, nous avons arrêté notre choix sur le mélange éther de pétrole (40-60°C)/dichloroéthane/acétate d'éthyle (10/4/3 : v/v/v). Dans ces conditions expérimentales l'aclonifen présente un comportement chromatographique en spot bien défini avec un R_f de 0,89 (figure I, 3).

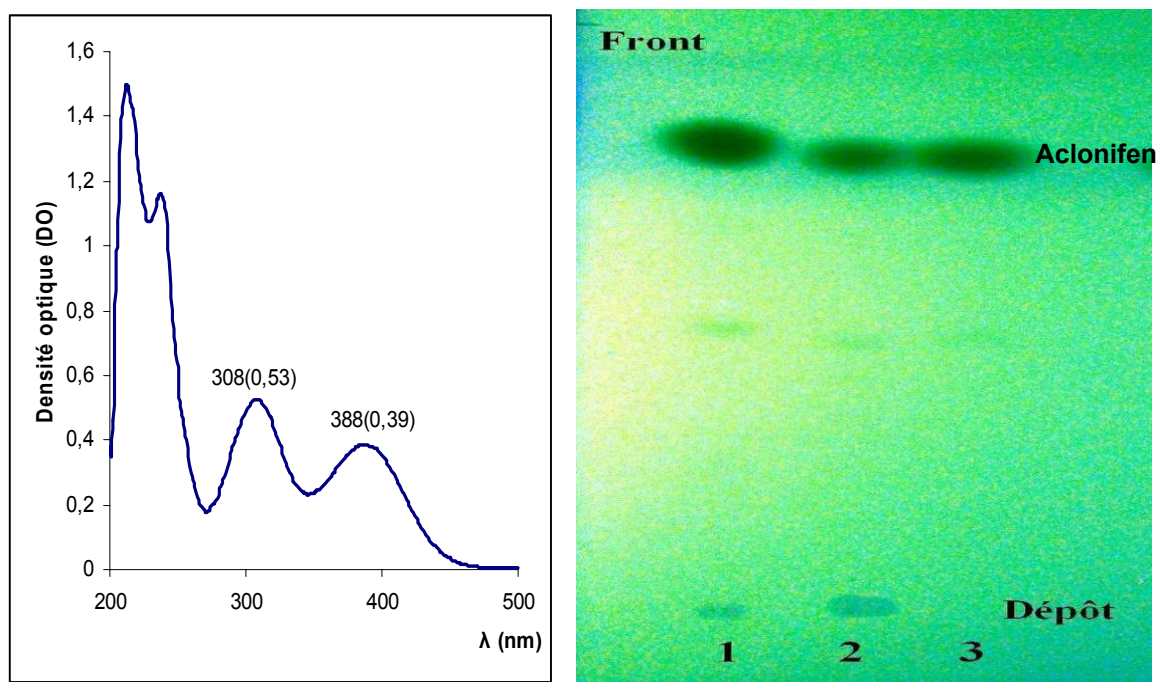


Figure I, 3 : Spectre UV/visible d'une solution éthanolique d'aclonifen [$2 \cdot 10^{-2}$ M] (avec max et DO aux pics entre parenthèse) et chromatogramme permettant la mise en évidence de l'aclonifen à différents stades de purification des cristaux obtenus. Silice F₂₅₄, les dépôts 1, 2, et 3 correspondent à des étapes de purification indiquées figure I, 2. Solvant : EP (40-60°C)/dichloroéthane/acétate d'éthyle (10/4/3 : v/v/v). Photographie sous UV 254 nm.

Sous éclairage UV l'aclonifen présente une très forte absorbance à 254 nm et une fluorescence faible bleutée à 366 nm. Sous lumière visible le spot apparaît jaune, couleur

typique des composés aromatiques nitrés. Une modification du pH du solvant chromatographique du côté alcalin ou du côté acide ne change rien au comportement chromatographique de l'aclonifen.

3) Analyse spectrophotométrique d'une solution éthanolique d'aclonifen :

La solubilisation de l'aclonifen dans l'éthanol est grande. Notre analyse spectrale, réalisée avec une solution éthanolique [$2 \cdot 10^{-2}$ M], a été effectuée en UV et visible (figure I, 3). Le tracé nous montre deux pics d'absorbance principaux, l'un dans le visible ($\lambda_{\text{max}} = 388$ nm) et l'autre dans l'UV long ($\lambda_{\text{max}} = 308$ nm). Deux pics importants dans l'UV court (212 et 237 nm) sont visibles sur le tracé. Pour les deux pics caractéristiques (308 et 388 nm) les coefficients d'extinction moléculaire (ϵ) sont respectivement de 7720 à 388 nm et de 10500 à 308 nm. Les variations de pH au sein de la solution éthanolique par ajout de KOH et HCl n'entraînent que des modifications mineures du tracé spectral (petites variations du rapport des hauteurs de pics 388/308, petits déplacements des λ_{max} , tableau I, 1)

Tableau I, 1 : Comparaison des longueurs d'onde maximales et des coefficients d'extinction moléculaire obtenus à partir de spectres UV/visible de solutions éthanoliques d'aclonifen à pH 3 (HCl), à pH 6 (EtOH seul) et à pH 11 (KOH).

	Pic visible (nm)	Pic UV (nm)	ϵ_{388}	ϵ_{308}
EtOH (pH = 6)	388	308	7720	10500
+HCl (pH = 3)	383	309	8500	11760
+KOH (pH=11)	386	306	10240	15280

Ces résultats nous conduisent à penser que *l'aclonifen est une molécule de petite taille, à caractère lipophile et non ionisable* dans une fourchette de pHs comprise entre 3 et 11. Ainsi, dans l'ensemble des compartiments du végétal où l'aclonifen sera susceptible de se retrouver, il sera toujours sous sa forme lipophile moléculaire : les pHs des compartiments végétaux les plus acides se retrouvant dans la paroi cellulosique (jusqu'à 4-4,5) et les vacuoles (5,5-6), et les pHs les plus alcalins étant proches de 8,5 (contenu des tubes libériens, stroma des chloroplastes à la lumière).

4) Mise en évidence et caractérisation des symptômes liés à l'action herbicide de l'aclonifen : Toutes les observations qui vont être décrites ont été réalisées lors d'expérimentations de laboratoire et non de plein-champ, ce qui peut changer beaucoup de choses sur l'intensité des symptômes, leur rapidité de mise en place, leur amplitude (les différences majeures entre les conditions de nos salles conditionnées et l'extérieur étant

l'intensité et la qualité du spectre lumineux ainsi que les variations de température). Pour les tests sur **plantes sauvages** (vulpin, moutarde sauvage et moutarde blanche, morelle noire, oxalis, lamier, chiendent et même ...une prêle !!!) mais aussi pour le **colza**, les expérimentations sont réalisées en serre thermiquement peu isolée et largement soumise aux conditions extérieures de température et de lumière (en périodes hivernales un chauffage d'appoint était installé pour ne pas descendre en dessous de 0°C durant la nuit en particulier). La conséquence est un développement plus lent des jeunes plants. De toute manière nous n'avons pas réussi, avec les semences de ces mauvaises herbes et avec le colza, de cultures « sérieuses » en chambre conditionnée. Dans la pratique routinière du laboratoire, il est plus facile d'obtenir rapidement et de manière standardisée des plantes cultivées que sauvages pour lesquelles les conditions de germination-levée de dormance, de croissance optimale sont plus compliquées à réunir. Aussi, nos observations ont-elles été réalisées essentiellement sur plantes cultivées sans nous soucier pour l'instant du réalisme agronomique. Notre intention était d'abord d'obtenir des symptômes d'intoxication, de décrire ces symptômes et leur cinétique d'apparition, d'observer éventuellement des différences de comportement entre espèces végétales.

5) Observation au laboratoire des symptômes visibles liés à l'activité de l'aclonifen :

Dans l'optique d'observer des effets liés à l'emploi de l'aclonifen nous avons choisi un dispositif expérimental où la biodisponibilité de l'herbicide était maximale, en évitant les rapports complexes existant entre complexe argilo-humique et matière active. Pour ce faire nous avons choisi de faire des solutions vraies d'aclonifen (avec, dans les solutions de traitement, un maximum de 5% de DMSO ou de 1% d'éthanol) servant à imbiber un substrat (sable 1-2 mm) inerte du point de vue adsorption de la matière active (préparation de **solutions** aqueuses **vraies** comprises entre $[10^{-7}\text{M}]$ et $[5.10^{-4}\text{M}]$ d'aclonifen, ($[5.10^{-4}\text{M}]$ étant la limite maximale de solubilisation dans l'eau obtenue avec des solutions mères préparées dans le DMSO). Dans tous les cas, il s'agit bien évidemment de traitements privilégiant une pénétration racinaire. Les quantités d'eau par pot ont été calculées pour qu'avec la concentration la plus élevée ($[5.10^{-4}\text{M}]$), la quantité d'aclonifen par pot corresponde à 5 fois la dose agronomique (13,3 mg/pot), qui serait délivrée au champ sur 100 cm² de sol (soit la surface du pot d'expérimentation).

Aucun symptôme n'est détecté pour des concentrations inférieures à $[5.10^{-6}\text{M}]$. Des résultats nets sont déjà observables par exemple sur blé ou maïs avec $[5.10^{-5}\text{M}]$ (demi-dose agronomique soit 1,33 mg/pot) d'aclonifen (figure I, 4) et sont assez largement semblables sur

ces deux monocotylédones, la première feuille reste partiellement chlorophyllienne, les feuilles 2-3 et 4 sont **fortement dépigmentées** sur les parties basses et les extrémités sont encore plus ou moins chlorophylliennes, les feuilles suivantes (si la culture est suffisamment longue) sont totalement blanches mais fortement desséchées.

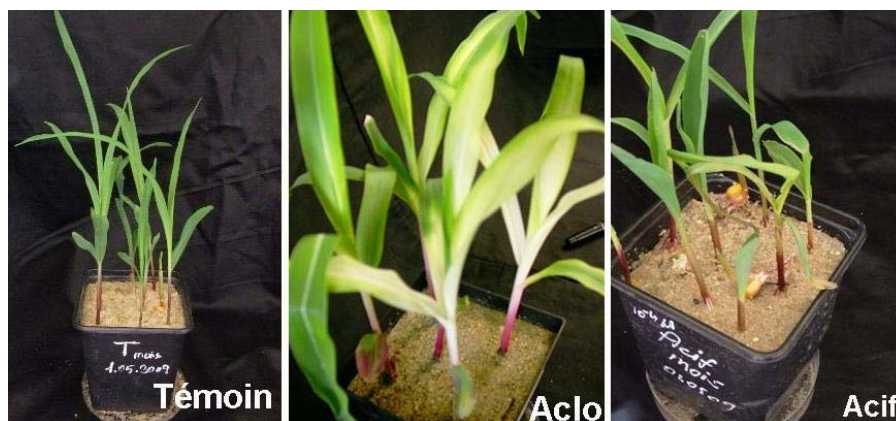


Figure I, 4 : Symptômes de dépigmentation foliaire sur plantules éclairées de maïs âgées de 13 jours. Au centre : traitement avec $[5.10^{-5} \text{ M}]$ d'aclonifen. A gauche : témoin et à droite : traitement avec $[10^{-4} \text{ M}]$ d'acifluorfen. Ce dernier traitement montre des symptômes de nécroses dans la moitié inférieure des feuilles (feuilles « cassées » en deux).

La deuxième observation qui peut être faite sur plantes traitées à l'aclonifen suivant notre protocole, est l'apparition tardive de zones de nécroses sur les feuilles. Celles-ci se développent à partir de la marge des feuilles pour envahir, *in fine*, tout le limbe qui se retrouve dépigmenté et sec, les nécroses ayant ouvert des « brèches » dans des feuilles qui, de ce fait, sont incapables de réguler leurs pertes d'eau. Lors d'incidents techniques sur la régulation de la température de la chambre de culture (montée en température jusqu'à 30°C – au lieu de 24°C durant la période de jour), et lors du rapprochement des sources lumineuses à 20 cm des plantules traitées, nous avons noté une très nette accélération des phénomènes nécrotiques (comparaison avec une température de 24°C et un éclairage éloigné d'un mètre des plantes).

De la même manière, nous avons noté que des variations de température mais surtout de l'intensité lumineuse contrôlait l'apparition des symptômes nécrotiques. En particulier, en serre, des effets nécrotiques très marqués et brutaux ont été enregistrés à la suite d'une journée très lumineuse et ensoleillée (nombreuses observations sur vulpin, colza).

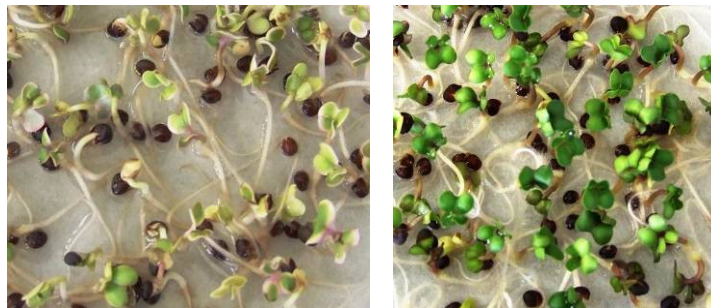
Sur l'ensemble des espèces analysées, différentes situations apparaissent :

- quatre espèces réagissent fortement et sont à notre avis plus sensibles que les autres espèces testées : le colza, la moutarde blanche, vulpin et la laitue. Avec ces espèces, aux concentrations agronomiques, seuls les cotylédons apparaissent, blanchissent totalement et se

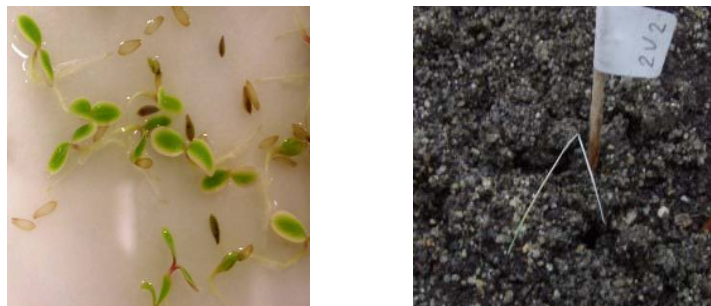
nécrosent. Le méristème de tige ne produit rien. Avec ces espèces très sensibles, ces symptômes sont déjà maximum à la dose de $[5.10^{-5}M]$ (demi-dose agronomique),



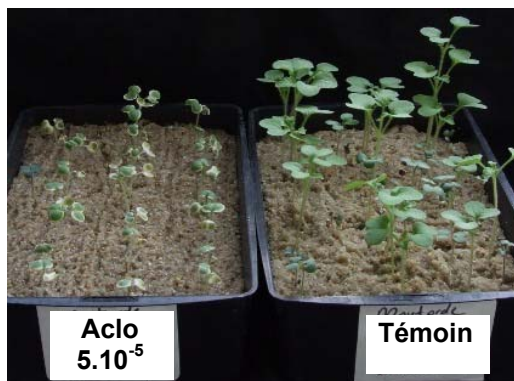
Moutarde blanche (dose agronomique) : dépigmentation des cotylédons et nécroses



Colza sur boîte de Pétri, dose agronomique 8 jours. Cotylédons décolorés d'abord à la marge.



Laitue (à gauche) sur boîte de Pétri et vulpin (à droite) sur substrat sol (doses agronomiques). Cette dernière espèce n'émet qu'une première feuille qui se nécrose dans le 1/3 inférieur et se courbe en deux.



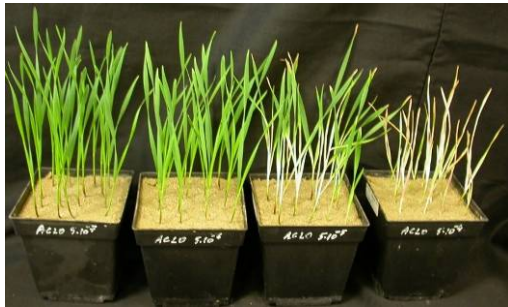
Moutarde blanche $[5.10^{-5}M]$ et son témoin,



Radis $[10^{-4}M]$

Chapitre I : Symptomatologie liée à l'effet herbicide de l'aclonifen

- pour la majorité des espèces étudiées (blé, maïs, vulpin, moutarde sauvage, oxalis, chiendent), les symptômes d'intoxication débutent à $[5.10^{-6} \text{ M}]$ pour être maximum à la concentration la plus forte,



Blé de 12 jours : traitements $[5.10^{-6}, 5.10^{-5}, 10^{-4} \text{ M}]$



Oxalis avec traitement $[10^{-4} \text{ M}]$



Luzerne $[2.10^{-4} \text{ M}]$ et son témoin



Moutarde sauvage $[10^{-4} \text{ M}]$

- avec la carotte caractérisée par une racine pivotante une particularité du traitement apparaît : la décoloration de la pigmentation orange de la racine (organe à l'abri de la lumière : Il y a ouverture pour l'aclonifen d'un espace cible racinaire dont les conséquences physiologiques semblent proches de zéro).



Carotte témoin et traitement $[10^{-4} \text{ M}]$



Morelle noire et prêle traitement $[10^{-4} \text{ M}]$



- la morelle noire (d'origine complètement sauvage), la prêle (provenant de notre échantillon de terre franche) et le tournesol (qui sera détaillé plus loin) ne présentent aucun symptôme visible de toxicité.

- De cette observation qualitative des symptômes liés à l'activité herbicide de l'aclonifen nous retiendrons l'apparition d'une double symptomatologie :

- une perte totale de pigmentation des parties chlorophylliennes si la quantité d'aclonifen apportée permet l'obtention d'une concentration critique nécessaire à l'effet physiologique. Cette perte de pigment correspond à une double perte, des chlorophylles et des caroténoïdes (la littérature parle d'effet « *»bleaching»* ») ;

- une apparition de zones de nécroses sur le limbe des plantes traitées. Ces nécroses sont sous la dépendance de l'intensité du flux lumineux et, semble-t-il, pour une moindre part de la température (élevée). En absence d'un flux lumineux suffisant les symptômes de « *»bleaching»* » apparaissent mais pas les nécroses. De ce point de vue, l'énergie reçue en plein champ par les plantules semble toujours suffisante pour atteindre le stade nécroses si la concentration critique est atteinte dans l'organe foliaire (éclairage maximum en juin = environ 1300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

Chez les graminées étudiées (blé, maïs, vulpin) nous avons remarqué systématiquement une décoloration partielle de la première feuille et parfois de la 2^{ème}. Cette dépigmentation partielle, à localisation précise (les extrémités vertes et la base blanche), peut probablement s'expliquer en partie par une migration difficile de l'aclonifen entre le substrat contaminé et la feuille représentant l'espace cible. Cependant, le mode elongation des cellules foliaires chez les graminées est également propice à de tels symptômes. La jeune plantule pré-germée aurait le temps de développer une partie de sa première feuille avant que la concentration en aclonifen apporté par les racines soit suffisante au niveau foliaire pour bloquer la synthèse de la chlorophylle. En effet, chez les graminées, la croissance de la feuille se fait en deux temps : elongation de la partie apicale puis basale. Ainsi, quand la première feuille finit sa croissance, l'aclonifen a eu le temps de migrer suffisamment pour assurer une concentration critique susceptible de déclencher les symptômes dans la partie basale. Dans nos conditions de culture, une symptomatologie assez largement identique (c'est-à-dire l'inhibition de l'accumulation de pigments photosynthétiques) à celle décrite pour le maïs est observée avec des plantules de blé et de vulpin. La circulation de la matière active par systémie xylémienne se fait probablement plus lentement que celle de l'eau qui sera transpirée.

6) Effet de l'aclonifen sur la croissance des plantules de blé et de maïs :

Des cultures de blé et de maïs ont été menées en parallèle sur une période de 25 jours. A côté des pots témoin les cultures ont été traitées à l'aclonifen (aux concentrations suivantes :

$[5.10^{-7} \text{ M}, 5.10^{-6} \text{ M}, 5.10^{-5} \text{ M}, 10^{-4} \text{ M}, 2,5.10^{-4} \text{ M} \text{ et } 5.10^{-4} \text{ M}]$. Parallèlement, l'acifluorfen et le norflurazon ($[10^{-4} \text{ M}]$) ont été utilisés comme témoins d'une inhibition sélective de la synthèse des chlorophylles ou de la synthèse des caroténoïdes.

6a) Elongation de la plantule en fonction du temps : longueur des racines et des feuilles :

Nous avons mesuré l'incidence des traitements aclonifen sur l'élongation racinaire (mesures à 25 jours de culture) et foliaire (mesures à 12 et 25 jours) chez le blé et le maïs. Les résultats portant sur plantules de blé et de maïs sont présentés figures I, de 5 à 8.

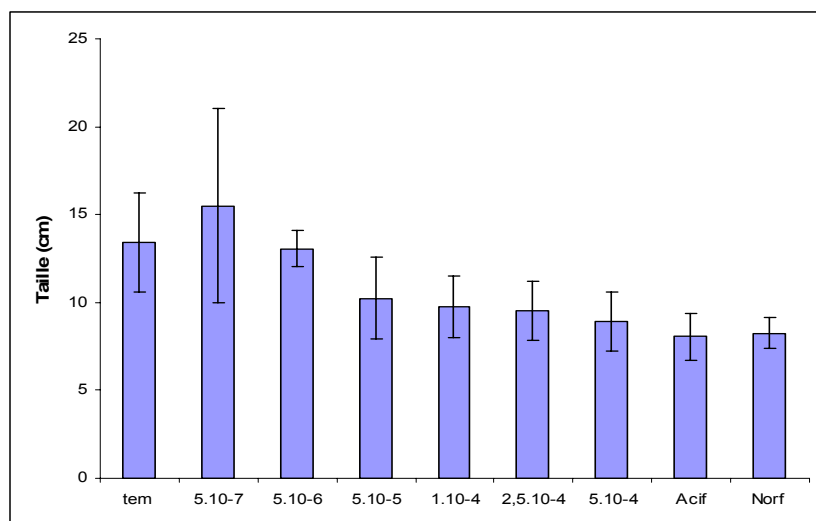


Figure I, 5 : Cumul des longueurs des racines de plantules de blé âgées de 25 jours et traitées par l'aclonifen à différentes concentrations.

Comparaison avec l'acifluorfen (Acif) et le norflurazon (Norf) $[10^{-4} \text{ M}]$. Tem : témoin. Ecart-type $n=12$ individus

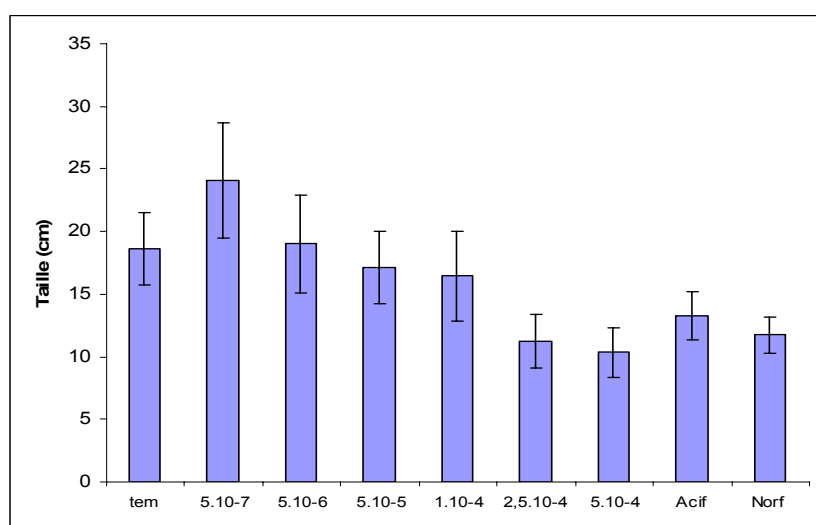


Figure I, 6 : Cumul des longueurs des racines de plantules de maïs âgées de 25 jours et traitées par l'aclonifen à différentes concentrations.

Comparaison avec l'acifluorfen (Acif) $[10^{-4} \text{ M}]$ et le norflurazon (Norf) $[10^{-4} \text{ M}]$. Tem : témoin. Ecart-type $n=9$ individus.

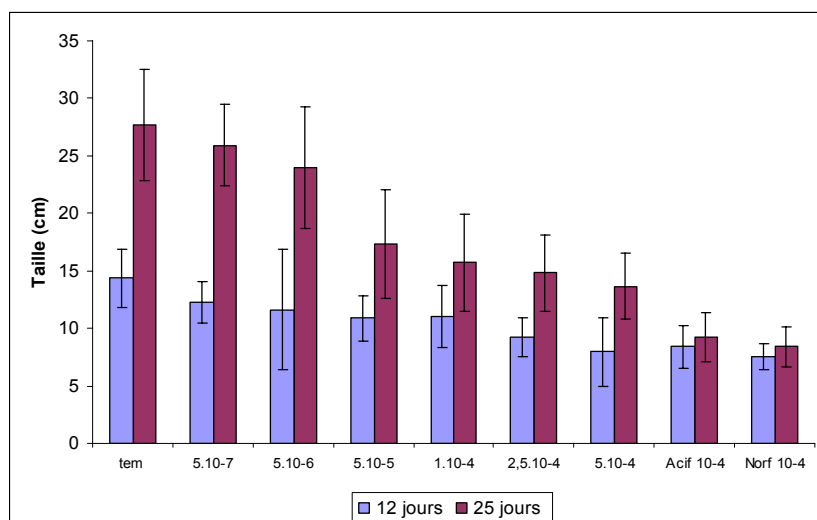


Figure I, 7 : Effets d'une concentration croissante en aclonifen sur l'élongation foliaire de plantules de blé cultivées sur sable contaminé. Les mesures sont effectuées à 12 puis 25 jours. Acif = acifluorfen [10^{-4} M], Norf = norflurazon [10^{-4} M]. Ecart-type n=12 plantules

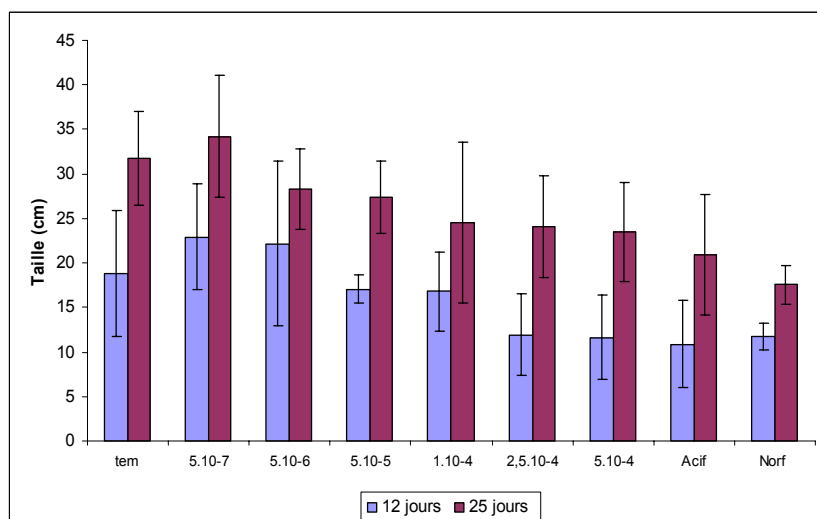


Figure I, 8 : Effets d'une concentration croissante en aclonifen sur l'élongation foliaire de plantules de maïs cultivées sur sable contaminé. Les mesures sont effectuées à 12 puis 25 jours. Acif = acifluorfen [10^{-4} M], Norf = norflurazon [10^{-4} M]. Ecart-type n=9 plantules

L'allure des résultats (figures I, 5, 6, 7, 8) tant au niveau foliaire que racinaire, sur les deux espèces végétales analysées est la même. Il y a une légère décroissance liée à la concentration en aclonifen présent au niveau des substrats de culture. Dans les deux cas et pour les 2 types d'organes mesurés, il semble y avoir un effet légèrement stimulant de la concentration en aclonifen la plus basse utilisée ($[5.10^{-7}\text{M}]$ ne donnant aucun symptômes visibles). Avec les concentrations plus fortes la décroissance mesurée ne dépasse pas 25-30%. Des valeurs similaires sont aussi enregistrées lors de l'utilisation de l'acifluorfen et du norflurazon ($[10^{-4}\text{M}]$). Avec les résultats de l'analyse statistique on est en droit de considérer que l'atteinte de la croissance lors de l'utilisation de l'aclonifen en traitement racinaire n'est que de faible importance sur la taille du chevelu racinaire et sur la longueur des feuilles.

6b) Evolution de la biomasse et du contenu pigmentaire en fonction de la concentration en herbicide appliquée au substrat :

Les cultures de blé et maïs sont conduites sur sable en salle conditionnée. La biomasse fraîche diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en aclonifen avec les deux espèces étudiées. Cette perte de biomasse est maximale à la concentration la plus forte en aclonifen (de l'ordre de 65% pour le blé et pour le maïs). La perte de biomasse est encore plus forte avec l'acifluorfen et le norflurazon utilisés à $[10^{-4}\text{M}]$. Le maïs apparaît particulièrement sensible au norflurazon (perte de biomasse foliaire de 95%).

* La perte de biomasse fraîche foliaire se traduit, pour les deux espèces étudiées, par une perte de masse sèche, celle-ci diminuant progressivement avec l'augmentation des concentrations (figures I, 9, 10). Cette perte de biomasse peut être mise en relation avec une diminution progressive de la taille des individus cultivés sur des substrats de plus en plus contaminés. Enfin, la baisse de teneur en eau des feuilles de blé aux concentrations les plus fortes (aclonifen, acifluorfen et norflurazon) peut être liée, pour les deux DPE, à la mise en place de nécroses (non-visibles à l'œil nu sur cette expérimentation). Cette explication d'une altération du contrôle de l'eau par la feuille de blé n'explique cependant pas la perte d'eau liée à l'emploi du norflurazon.

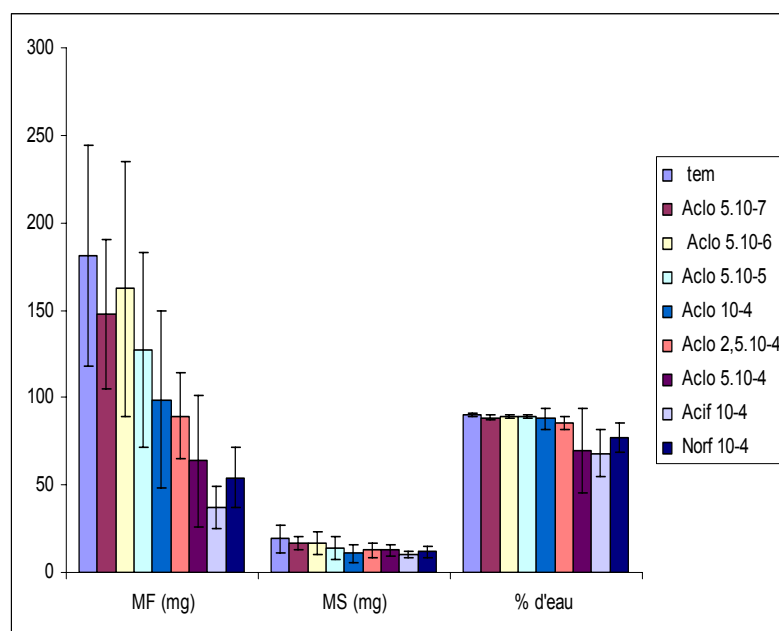


Figure I, 9 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS) et la teneur en eau (%) de feuilles de plantules de blé de 21 jours cultivées sur sable. Les valeurs sont une moyenne par plantule établie avec 12 échantillons (les barres statistiques correspondent à l'écart-type). Les herbicides utilisés sont l'aclonifen ($[5.10^{-7}$ à $5.10^{-4}\text{M}]$, l'acifluorfen $[10^{-4}\text{M}]$ et le norflurazon $[10^{-4}\text{M}]$.

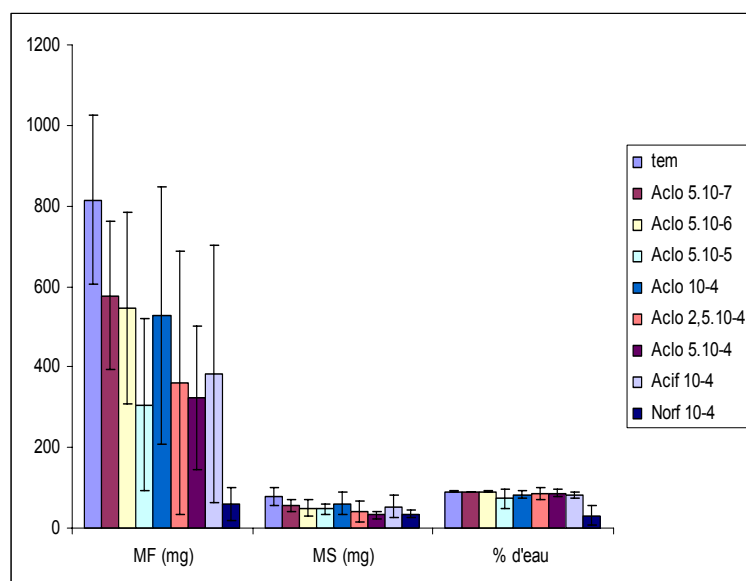


Figure I, 10 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS) et la teneur en eau (%) de feuilles de plantules de maïs de 21 jours cultivées sur sable. Les valeurs sont une moyenne par plantule établie avec 9 échantillons (les barres statistiques correspondent à l'écart-type). Les herbicides utilisés sont l'aclonifen ($5 \cdot 10^{-7}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ M), l'acifluorfen [10^{-4} M] et le norflurazon [10^{-4} M].

Une étude parallèle à celle décrite pour les parties foliaires de maïs et blé a été conduite sur les parties racinaires (masse fraîche, masse sèche et teneur en eau, figures I, 11, 12). La décroissance de biomasse en fonction de la dose du traitement herbicide n'est pas aussi nette que celle observée pour les parties aériennes. D'une manière très globale, chez le blé, la décroissance de la masse fraîche racinaire est de l'ordre de 30% sans lien clair avec la concentration herbicide appliquée. Cette décroissance se répercute au niveau des résultats de masses sèches. La situation est encore plus contrastée avec le maïs dont la masse fraîche racinaire progresse de manière curieuse en passant de $[5 \cdot 10^{-5} \text{ M}]$ à $[10^{-4} \text{ M}]$. Pour les concentrations intermédiaires en aclonifen la perte de masse racinaire est de l'ordre de 60%. D'une manière globale, sur les deux espèces, les concentrations herbicides entraînent une diminution du chevelu racinaire qui peut être reliée au déficit de photosynthèse consécutif à la disparition partielle ou totale des pigments associés à l'acte photosynthétique. La teneur en eau des racines ne varie pas en fonction des concentrations en herbicide : les herbicides utilisés n'ont pas de cibles biochimiques dans un compartiment racinaire maintenu à l'obscurité et de ce fait ne doivent pas perturber les équilibres osmotiques de ce compartiment et l'eau du substrat qui est maintenu constant par des apports quotidiens d'eau (mesure quotidienne des déficits des pots sur 24h et compensation).

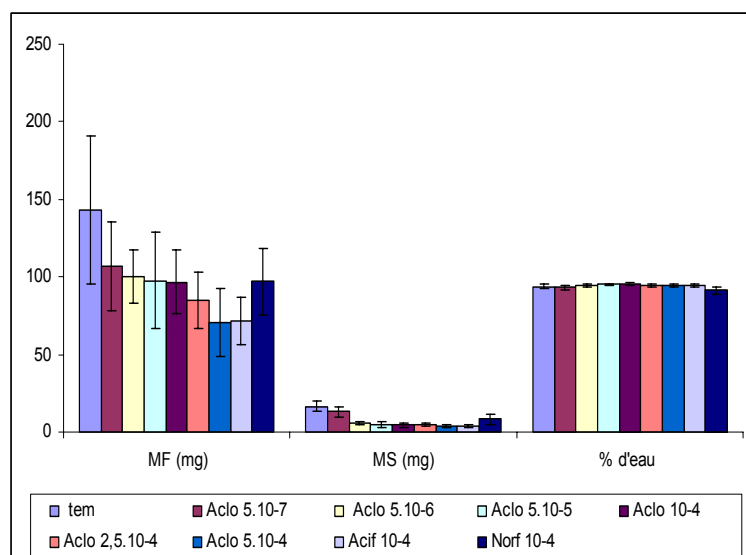


Figure I, 11 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS) et la teneur en eau (%) de racines de plantules de blé de 21 jours cultivées sur sable. Les valeurs sont une moyenne par plantule établie avec 12 échantillons (les barres statistiques correspondent à l'écart-type). Les herbicides utilisés sont l'aclonifen ($[5.10^{-7}]$ à $5.10^{-4}M$], l'acifluorfen $[10^{-4}M]$ et le norflurazon $[10^{-4}M]$. tem = témoin

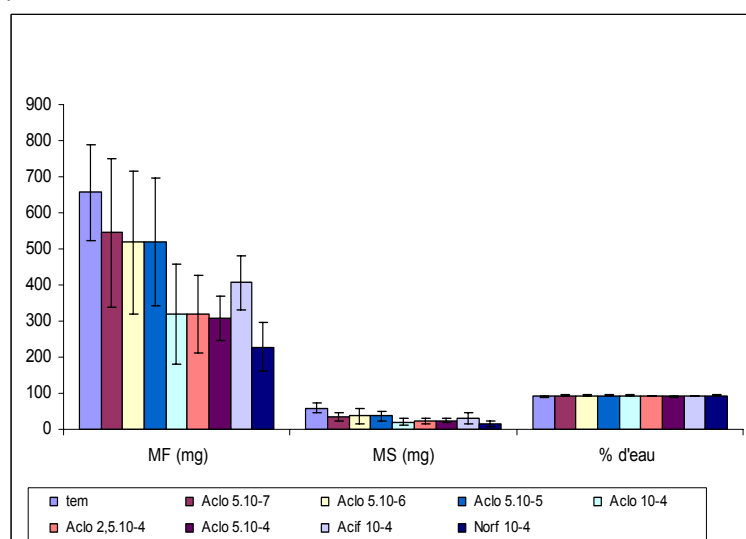


Figure I, 12 : Impact de traitements herbicides sur la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS) et la teneur en eau (%) de racines de plantules de maïs de 21 jours cultivées sur sable. Les valeurs sont une moyenne par plantule établie avec 9 échantillons (les barres statistiques correspondent à l'écart-type). Les herbicides utilisés sont l'aclonifen ($[5.10^{-7}]$ à $5.10^{-4}M$], l'acifluorfen $[10^{-4}M]$ et le norflurazon $[10^{-4}M]$. tem = témoin.

*La troisième partie de l'étude biométrique concerne la quantification des contenus pigmentaires dans les parties aériennes de plantules de blé et de maïs âgées de 12 jours (afin d'éviter d'avoir aux concentrations herbicides les plus fortes, des organismes physiologiquement dégradés). C'est le contenu de la deuxième feuille qu'il a été choisi d'analyser car du fait de la dépigmentation partielle majoritairement localisée dans la moitié basale du limbe, nous avons l'assurance d'atteindre avec certaines doses d'herbicide la concentration critique herbicide. Ces dosages pigmentaires des chlorophylles et caroténoïdes ont été réalisés sur des plantes ayant subi un traitement aclonifen allant de $[5.10^{-7}]$ à $5.10^{-4}M$. Pour l'acifluorfen et le norflurazon, c'est la concentration $[10^{-4}M]$ qui a été choisie.

L'évolution du contenu pigmentaire de la feuille n°2 chez le blé (3 répétitions), est présentée figure I, 13. Les résultats statistiques montrent que le contenu pigmentaire ne varie pas jusqu'à $[5.10^{-6}M]$ (nous avons même l'impression (déjà mentionnée) qu'à la dose de $[5.10^{-7}M]$ l'aclonifen pourrait favoriser légèrement la chlorophyllogénèse). Pour les concentrations plus élevées, les inhibitions sur les chlorophylles a et b sont très parallèles, cette situation est très logique car le point d'inhibition des DPE sur la voie biochimique des chlorophylles est positionné très en amont. A partir de la concentration $[5.10^{-5}M]$ en aclonifen, 80 à 90% du contenu chlorophyllien a disparu. L'effet le plus marqué est celui obtenu avec le norflurazon $[10^{-4}M]$, le contenu chlorophyllien n'est plus que de 3%. Avec l'acifluorfen $[10^{-4}M]$, le blocage de la synthèse des chlorophylles est voisin de 50%. A la même concentration, avec l'aclonifen, la somme des chlorophylles a et b ne représente plus que 10% du contenu du témoin.

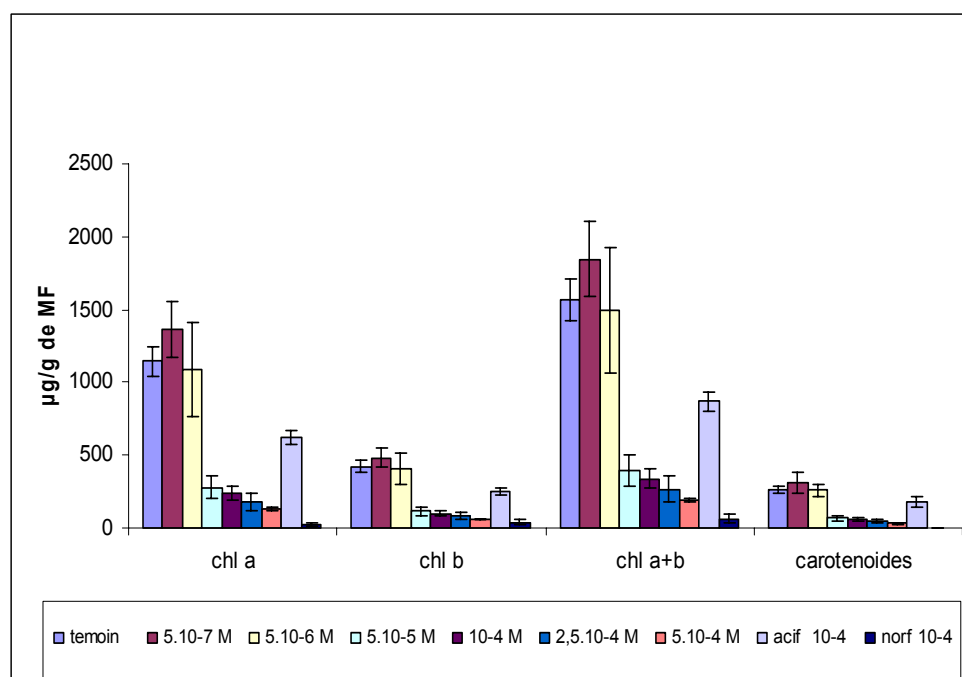


Figure I, 13 : Contenu pigmentaire de plantules de blé de 12 jours : effet sur ce contenu de traitements herbicides. Les herbicides utilisés sont l'aclonifen $[5.10^{-7}$ à $5.10^{-4}M]$, l'acifluorfen $[10^{-4}M]$ et le norflurazon $[10^{-4}M]$. Les résultats indiqués (en $\mu g/g$ de masse fraîche) sont une moyenne de 3 répétitions. chl a = chlorophylle a, chl b = chlorophylle b, chl a+b = somme des chlorophylles.

Pour ce qui est du contenu en caroténoïdes, comme pour les chlorophylles, il y a une chute dramatique du contenu foliaire à partir de $[5.10^{-5}M]$ en aclonifen, le contenu ne représentant plus que 5 à 10% du contenu du témoin. Avec le norflurazon $[10^{-4}M]$, la disparition est totale. Notons qu'avec l'acifluorfen décrit comme inhibiteur stricte des chlorophylles, la teneur en caroténoïdes chute de 40% pour une concentration de $[10^{-4}M]$ ce qui laisse supposer une possible synthèse de caroténoïdes avant que la concentration critique soit atteinte dans la plantule traitée.

La figure I, 14 résume la situation pigmentaire obtenue avec des plantules de maïs (2^{ème} feuille) de 12 jours ayant subi des traitements herbicides à l'aclonifen ($[5.10^{-7}$ à 5.10^{-4} M], l'acifluorfen $[10^{-4}$ M] et au norflurazon $[10^{-4}$ M]. La décroissance pigmentaire est nettement moins marquée que chez le blé traité dans les mêmes conditions. Cette décroissance marquée ne commence qu'à $[10^{-4}$ M] d'aclonifen est atteinte environ 50%. Par contre, les plantes traitées avec le norflurazon $[10^{-4}$ M] n'ont plus aucun pigment dosable.

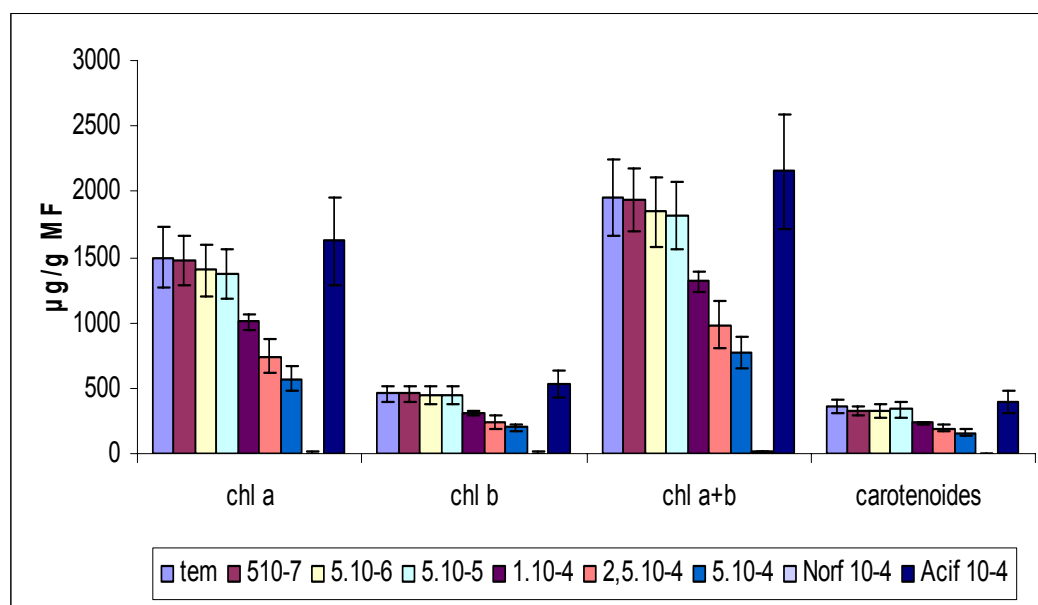


Figure I, 14 : Contenu pigmentaire de la feuille n°2 de plantules de maïs de 12 jours : effet sur ce contenu de traitements herbicides. Les herbicides utilisés sont l'aclonifen $[5.10^{-7}$ à 5.10^{-4} M], et le norflurazon $[10^{-4}$ M]. Les résultats indiqués (en $\mu\text{g/g}$ de masse fraîche) sont une moyenne de 3 répétitions. chl a = chlorophylle a, chl b = chlorophylle b, chl a+b = somme des chlorophylles.

* Une situation hétérogène du contenu pigmentaire existe dans les premières feuilles de graminées. La figure I, 15 correspond à trois morceaux d'une feuille de maïs prélevée sur des plantules de 12 jours. Cette feuille n°2 est issue de l'expérience décrite ci-dessus (figure I, 14). Trois segments de limbe (**a**, **b**, et **c** sur la photo de la figure I, 15) sont identifiés en fonction de leur position sur le limbe : le morceau **a** basal qui apparaît tout blanc, le morceau **b** intermédiaire qui laisse encore apparaître des traces légèrement vertes, et le morceau **c** correspondant à la partie apicale encore franchement chlorophyllienne. Chacun des morceaux est pesé puis traité séparément pour mesurer le contenu pigmentaire. L'opération est répliquée trois fois.

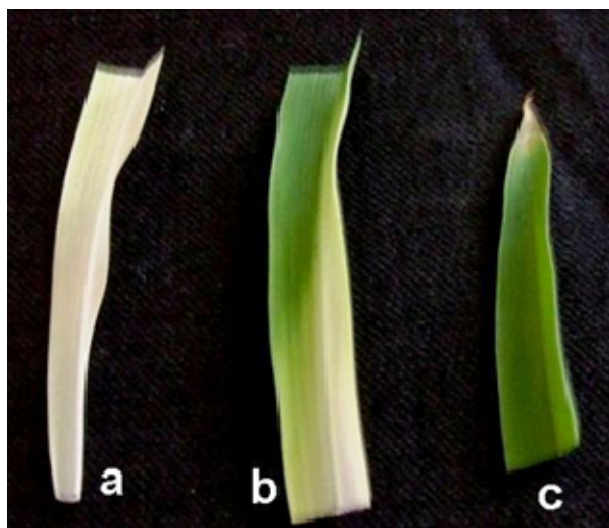


Figure I, 15 : Fragments de feuille de maïs (feuille n° 2) âgés de 12 jours. Les plantules utilisées sont issues de cultures sur sable contaminé avec de l'aclonifen [10^{-4} M]. a – partie basale de la feuille, b – partie intermédiaire, c – partie apicale. Chaque fragment mesure environ 4 cm.

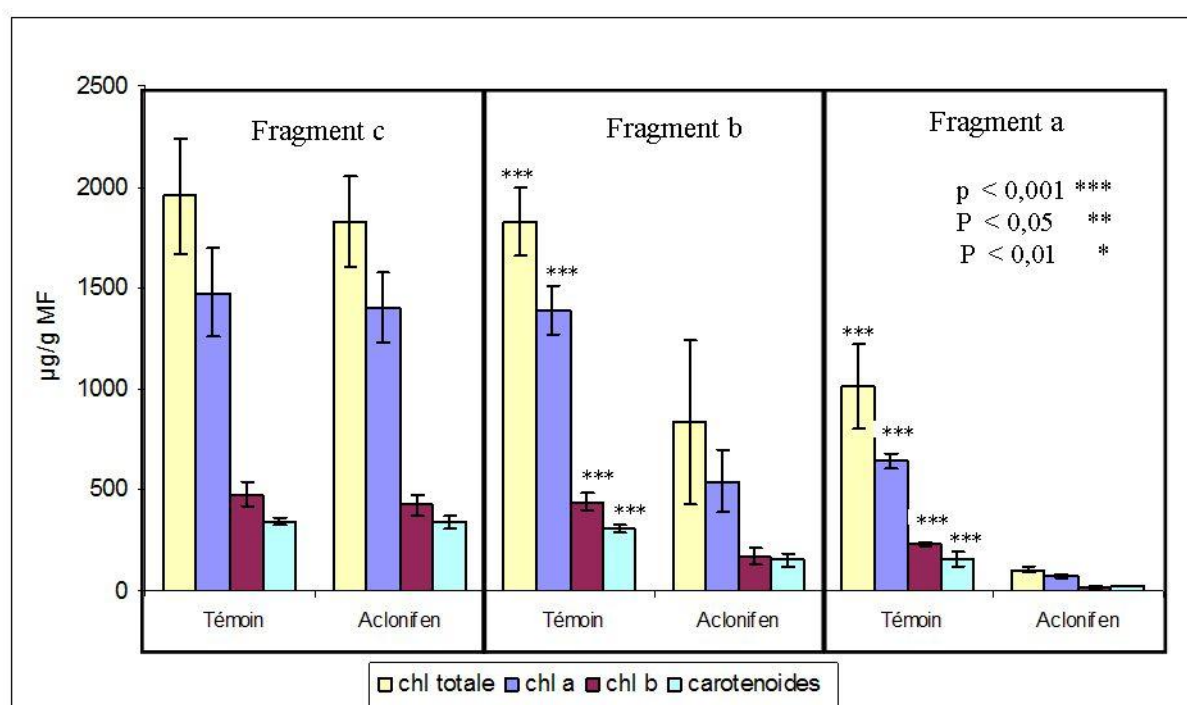


Figure I, 16 : Contenu pigmentaire ($\mu\text{g/g}$ de masse fraîche) de fragments (a, b et c) foliaires prélevés sur des plantules de maïs de 12 jours traitées en prélevée à l'aclonifen ($[10^{-4}\text{M}]$). a = partie apicale de la feuille, b = partie médiane de la feuille et, c = partie basale de la feuille. Les résultats exprimés sont la moyenne de 3 réplicats

Il existe une très nette hétérogénéité de composition pigmentaire entre les trois niveaux de la même feuille de maïs (figure I, 16). La teneur en chlorophylle décroît de 65% entre la partie sommitale de la feuille et la partie intermédiaire et de 95% avec la partie basale (résultats identiques pour la chlorophylle a et la b). La situation est quasiment la même pour les caroténoïdes. Cette disparité de composition pigmentaire mesurée entre l'apex et la base des feuilles n°2 de maïs (mais aussi de blé et de vulpin) est probablement corrélée à une disparité de concentration interne d'aclonifen couplée à une croissance en plusieurs temps de la feuille

des graminées. La partie apicale des feuilles est celle qui grandit le plus précocement alors que la plantule en est à ces premiers jours. Cette partie du limbe précocement formée se développe alors que l'aclonifen n'est pas encore arrivé sur ce site à des concentrations phytotoxiques. Cette observation laisse supposer que la migration xylémienne à partir d'une pénétration racinaire ne se fait pas au rythme de la circulation de la sève brute.

7) Mise en place d'une culture sur un substrat jouant un rôle adsorbant vis-à-vis des pesticides : Le protocole précédemment décrit mettait en jeu un substrat inerte (majoritairement le sable, quelquefois le papier filtre) vis-à-vis de l'adsorption de l'aclonifen. Afin de se rapprocher de conditions agronomiques nous avons, dans un troisième choix de substrat de culture, opté pour l'utilisation en pot d'un substrat composé uniquement de terreau horticole. Les pots sont de même taille que ceux utilisés avec le sable, la masse de terreau par pot est de 400 g et le protocole de contamination par l'herbicide est le même. Nous n'avons testé qu'une seule concentration en aclonifen ($[5.10^{-4} \text{ M}]$, limite de précipitation de la matière active). Les espèces soumises à expérimentation sont le maïs, le blé, la luzerne et la laitue. Dans ces conditions expérimentales choisies, nous n'avons pas observé d'effets majeurs liés à la présence d'aclonifen dans le terreau pur.

Une explication possible (qu'il s'agira de vérifier par des mesures fines de partition exprimant la force de liaison entre la matière organique et un pesticide – rapport, à volumes égaux, entre les quantités de matière active retenues sur la phase organique/quantités présentes dans l'eau), semble être que le très grand pouvoir d'adsorption d'une phase organique comme le terreau ne laisse, à l'équilibre des concentrations entre phase fixe (le terreau) et phase mobile (l'eau), qu'une concentration disponible faible d'aclonifen dans la phase aqueuse capturée par les racines et transférée vers les feuilles par la sève brute (système xylémienne).

Ainsi, pour l'instant, nous pensons que le pouvoir de rétention du terreau est trop fort pour permettre l'observation de symptômes liés à l'aclonifen appliqué à des doses agronomiques. Cela pose le problème de l'efficacité de cet herbicide suivant la composition du complexe argilo-humique du champ traité. Il apparaît très clairement que le niveau phytotoxique sera plus facilement obtenu sur sol sableux que sur un sol argileux fortement humifère. L'expérimentation en pot sur sable donne pour l'instant les résultats les plus visibles mais un compromis sable, terre franche, terreau doit être envisagé pour s'approcher d'un substrat de type complexe argilo-humique plus près de conditions classiques de plein champ.

8) Chronologie d'apparition des symptômes en sable contaminée:

La figure I, 17 donne une idée de la cinétique d'apparition des symptômes de dépigmentation et de nécroses liés à l'effet de l'aclonifen (exemples du maïs, de la moutarde blanche, du blé).

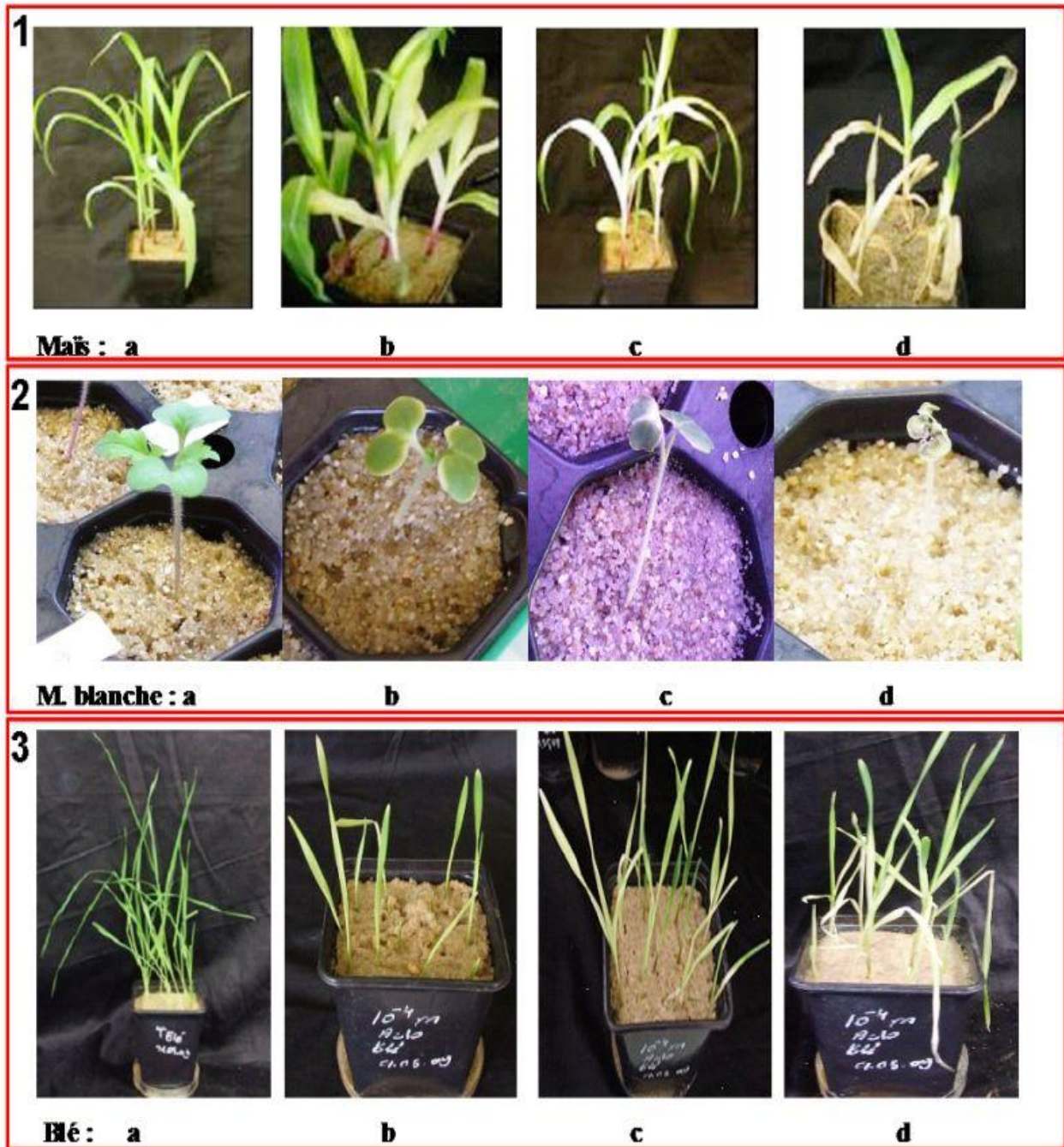


Figure I, 17 : Illustration photographique de la cinétique d'apparition des symptômes (dépigmentation puis nécroses) liés à l'emploi de l'aclonifen 1) Culture de maïs sur sable contaminé par $[5.10^{-5}M]$ d'aclonifen : a) témoin à 15 jours, b) 5 jours, c) 10 jours, d) 15 jours 2) Culture de moutarde blanche avec $[5.10^{-5}M]$ d'aclonifen. a) témoin à 15 jours, b) 8 jours, c) 10 jours, d) 15 jours 3) Culture de blé avec $[10^{-4}M]$ d'aclonifen). a) témoin à 15 jours, b) 8 jours, c) 10 jours, d) 15 jours

C-Discussion :

Ce chapitre nous a permis de nous familiariser avec l'aclonifen, herbicide de prélevée appartenant à la famille chimique des diphényléthers. Afin de se mettre dans les meilleures conditions d'acquisition de cette matière active par les plantes en culture nous avons choisi d'utiliser comme substrat un sable grossier et abondamment lavé avant utilisation. Sur une dizaine d'espèces végétales (plantes cultivées et adventices) nous avons essayé d'analyser la symptomatologie liée à l'emploi de l'aclonifen, en fonction de l'espèce, de la dose et du temps.

Pour la concentration la plus basse utilisée ($[5.10^{-7}M]$), nous n'avons observé aucun symptôme de phytotoxicité. Chez les deux espèces les plus étudiées (blé, maïs) nous avons même noté un léger effet favorisant la croissance des feuilles, des racines de même des teneurs en pigments photosynthétiques.

D'une manière globale, lorsque des symptômes sont visibles ceux-ci apparaissent avec une concentration de traitement de l'ordre de $[5.10^{-6}M]$. Ces symptômes concernent les parties foliaires qui perdent progressivement leur couleur verte pour devenir complètement blanches. Cette symptomatologie rappelle celle obtenue avec les inhibiteurs de la voie des isoprénoides dont l'exemple emblématique est le norflurazon. Par contre, avec un flux lumineux suffisamment puissant, il apparaît avec l'aclonifen une cascade de symptômes qui n'est pas observée avec le norflurazon : des nécroses dans les parties foliaires. L'ensemble de ces symptômes (blanchiment puis éventuellement nécroses) apparaissent après 5-6 jours de culture pour les plantes que nous cultivons en chambre conditionnée et entre 10 et 12 jours pour les plantes cultivées dans la serre du laboratoire.

Sur l'ensemble des espèces testées, quatre réagissent fortement à l'aclonifen. Il s'agit du colza, de la moutarde blanche, de la laitue et du radis. Pour des concentrations inférieures à la dose agronomique, ces plantes ne développent en général que leurs cotylédons qui blanchissent à la marge puis partout, et le méristème terminal sèche. Un deuxième groupe de plantes parmi lesquelles le blé, l'oxalis, la luzerne et la moutarde sauvage, montre de très forts symptômes à la dose agronomique ($[10^{-4}M]$). Un troisième groupe qui ne contient qu'une espèce : la carotte, correspond à un groupe peu sensible à l'herbicide avec cependant une cible biochimique atteinte dans la racine à savoir la synthèse du carotène (les plantes traitées ont un feuillage pigmenté normalement, seule la racine est de couleur jaune pâle). Enfin, un dernier groupe de plantes tolérantes aux plus fortes concentrations utilisées ($[5.10^{-4}M]$, soit 5 fois la dose agronomique) : le tournesol, la morelle noire, la prêle. Dans cette dernière catégorie peut probablement être rangé aussi le maïs pour des raisons de sélectivité par métabolisation. Nous

avons démontré au laboratoire que le maïs subissait à peu près autant que le blé les effets de l'aclonifen. Pourtant cette matière active est commercialisée en culture de maïs. Au champ, à la dose agronomique, la concentration dans l'eau du sol doit être bien inférieure à la dose de laboratoire lors de l'emploi d'une dose agronomique sur substrat sable. Dans les conditions du terrain, des mécanismes biochimiques de détoxification racinaires ou/et foliaires doivent être suffisamment puissants pour contrôler le flux de matière active en métabolites inefficaces sur les cibles biochimiques visées. Cette idée sera reprise plus loin dans ce travail.

CHAPITRE II.

MODE D'ACTION DE L'HERBICIDE ACLONIFEN.

L'aclonifen est un herbicide à large spectre, employé généralement en pré-levée, c'est-à-dire qu'il est positionné au champ alors que la culture et ses adventices n'ont pas encore germé (Acta, 2010). Cela signifie que l'effet herbicide escompté est dépendant du mouvement de la molécule dans le sol et dans la plante en train de germer et de croître, *via* les mouvements d'eau à courtes et/ou à grandes distances. Au cours de ce travail conduit la plupart du temps en conditions contrôlées (salle climatisée) ou semi-contrôlées (serre), nous avons appliqué majoritairement la matière active étudiée sur ou dans les substrats-soutiens de nos cultures. Suivant les conditions expérimentales et suivant les espèces végétales utilisées, nous avons observé une symptomatologie (chapitre I) qui pouvait varier suivant les conditions, entre la disparition totale ou partielle des pigments chlorophylliens et caroténoïdiques, une apparition ou non de nécroses foliaires différemment positionnées sur les plantules ou les plantes bien développées. De nombreuses dissections et observations de plantes nous ont montré que les atteintes racinaires n'étaient que rarement observables (renflements des extrémités racinaires faisant penser à une atteinte de la division cellulaire des apex) et uniquement dans des cas d'utilisation de concentrations en matière active dépassant largement les doses agronomiques homologuées ($[5.10^{-4}M]$).

De toutes ces observations, il découle que **l'espace-cible n° 1 pour l'aclonifen est l'espace foliaire chlorophyllien** et que le moyen pour la matière active de pré-levée d'atteindre cet espace est un passage obligatoire par la systémie xylémienne.

Après avoir décrit (chapitre I) une symptomatologie de l'aclonifen qui apparaissait plus complexe que celle des herbicides-types actuellement connus, notre deuxième préoccupation dans ce travail a été d'essayer de comprendre et de démêler le(s) mode(s) d'action physiologique(s) et biochimique(s) de ce diphényléther herbicide. Compte tenu d'une symptomatologie largement tournée vers une disparition partielle ou totale des pigments il devenait logique de chercher un mode d'action lié aux voies de biosynthèse des pigments impliqués dans l'acte photosynthétique.

A) La biosynthèse des chlorophylles et son blocage.

Avec l'apparition dans les années 80 de la série chimique des diphenyléthers (DPE), une nouvelle famille d'herbicides commerciaux est apparue agissant sur une cible biochimique nouvelle par inhibition d'une enzyme du stroma chloroplastique au sein de la voie de biosynthèse du noyau tétrapyrrolique (Beale, 1990 ; Duke et al., 1990 ; Scalla, 1991 ; Willows, 2002 ; Li et al 2003). Ce noyau est à la base de la structure chimique des chlorophylles et des cytochromes. (Wettstein et al., 1995 ; Tanaka et Tanaka, 2007) La construction de ce noyau azoté qui a pour origine biosynthétique la glutamine, est dépendante d'une étape stromatique contrôlée par la

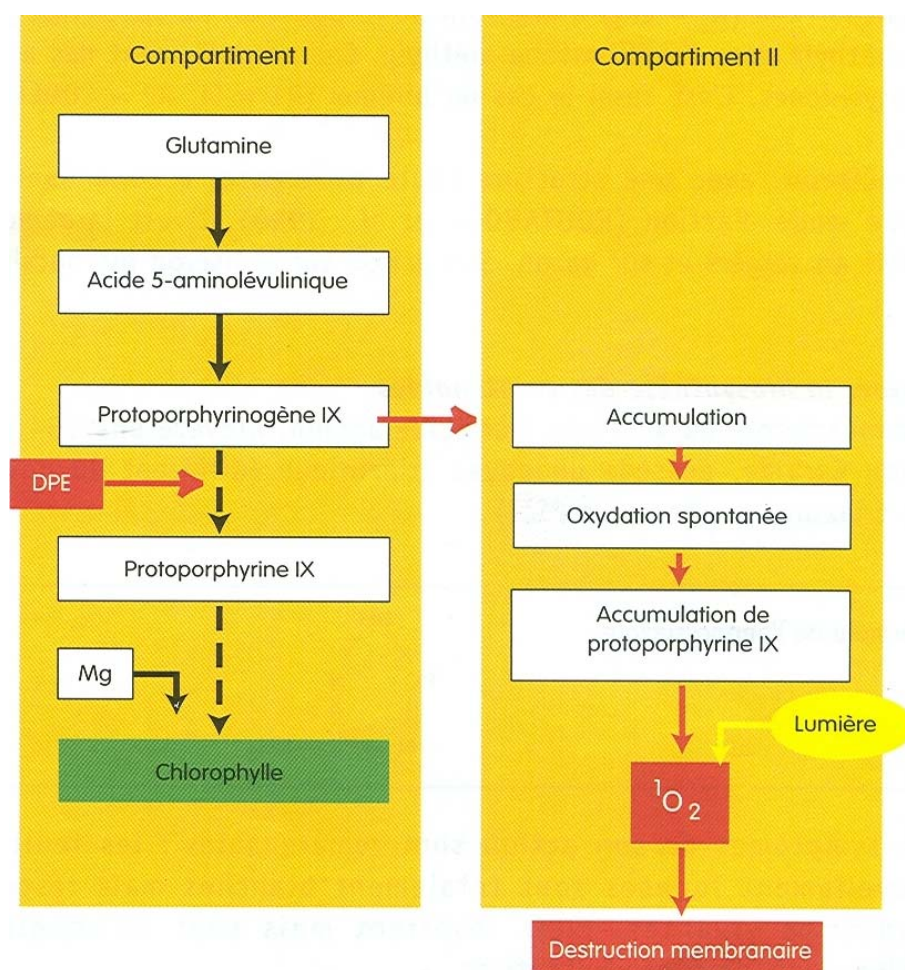


Figure II, 1 : Blocage de la biosynthèse des chlorophylles par les diphenyléthers vrais (DPE). Il s'en suit une délocalisation du protoporphyrinogène IX hors du chloroplaste. Compartiment I : stroma chloroplastique, Compartiment II extra chloroplastique (d'après Tissut et al., 2006).

protoporphyrinogène oxydase (figure II, 1), qui conduit à l'oxydation régulée du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine IX.

Principe de l'effet « DPE ». Les molécules possédant le noyau chimique diphényléther sont de puissants herbicides photo-dépendants et dont l'efficacité est directement dépendante de la quantité de lumière reçue (Matringe et al., 1990 ; Wikowski et Halling, 1989 ; Boger et Wakabayashi). Cet effet herbicide (largement démontré avec l'acifluorfen-Me) caractérisé par une destruction membranaire, a tout d'abord été partiellement décrit par Orr et Hess (1982) sur chloroplastes isolés. Le site biochimique d'action précis pour l'acifluorfen et la plupart des DPE a été clairement élucidé sur culture de cellule et plante entière par Matringe et Scalla (1988). La cible est une enzyme du stroma chloroplastique : la protoporphyrine oxydase située sur la voie biosynthétique qui transforme l'acide α -aminolévulinique (dérivé du glutamate) en chlorophylle (Rebeiz, 1973 ; Beale et Weinstein, 1990 ; Beale, 1999 ; Ladygin, 2000 ; Rüdiger, 2006 ; Tanaka et Tanaka, 2007). La protoporphyrine oxydase présente dans différentes organelles (chloroplastes, étioplastes, mitochondries) est inhibée par les DPE (Matringe et al., 1989 ; Witkowski and Halling, 1989 ; Walter et Shalygo, 1997 ; Beale, 1999 ; Graham, 2005). Ce blocage conduit à une accumulation et une translocation de protoporphyrinogène IX hors du chloroplaste. Par réaction spontanée avec l'oxygène cellulaire, cette dernière donne de la protoporphyrine IX qui, à la lumière, génère de l'oxygène actif qui va réagir en particulier avec les membranes (peroxydation) pour conduire à des nécroses cellulaires dans l'ensemble de la feuille. Avant cet état final conduisant à la mort de l'individu traité, la non pigmentation chlorophyllienne peut laisser apparaître une étape transitoire de feuilles non vertes et colorées en jaune du fait de la présence des caroténoïdes (Lehnen et al., 1990 ; Hallahan et al., 1992 ; Hess, 2000 ; Murata et al., 2004).

La plante atteinte par un DPE vrai ne peut plus assurer son fonctionnement normal, en particulier les feuilles nécrosées ne contrôlent plus les pertes d'eau : la plante à la lumière est condamnée à une mort (Duke et al., 1990 ; Scalla et Matringe, 1990 ; Jacobs et al., 1990, 1991) qui, pour des raisons physiologiques différentes, est identique à celle observée avec les inhibiteurs de la photosynthèse (blocage de la protéine D1 par les phénylurées ou les s-triazines, par exemple), ou avec les herbicides qui détournent les électrons à la sortie du PSI (type diquat, paraquat).

Chimiquement l'aclonifen est un diphényléther très proche de l'acifluorfen et du bifénox. Cependant, les symptômes obtenus avec cette molécule ne sont pas aussi clairs qu'avec ces deux derniers produits et la dépigmentation et la photodestruction des jeunes feuilles produites après traitement ne sont pas typiques. En effet, des symptômes observés font penser

à une atteinte concomitante de la biosynthèse des chlorophylles et des caroténoïdes (symptômes de « »bleaching» » total).

B) La biosynthèse des caroténoïdes et son blocage.

Les caroténoïdes sont des pigments de nature lipophile présents dans les chloroplastes au niveau de la membrane thylakoïdienne (Chappelle, 1995 ; Demmig-Adams, 1996). Ces molécules, généralement de couleur jaune, ont 40 atomes de carbone soit 8 unités isoprène (l'isoprène = C_5H_8), (Sandmann, 1994 ; Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004). Deux rôles majeurs sont joués par ces molécules au cours de l'acte photosynthétique : ils participent à la collecte de l'énergie solaire dans l'antenne collectrice et transmettent à la chlorophylle l'énergie capturée, mais aussi protègent les chlorophylles des photo-oxydations (Stahl et Sies, 2003 ; Sandmann et al., 2006). Leur biosynthèse fait partie de la voie dite des isoprénoïdes (composés lipophiles de type terpènes, sesquiterpènes, diterpènes, acide abscissique, gibbérellines, chaîne phytol des chlorophylles, tocophérols, vitamines E et K...), (Albrecht et Sandmann, 1994 ; Bick and Lange, 2003 ; Umeno et al., 2005). Au niveau le plus complexe et ultime de cette voie se trouve le 1^{er} niveau moléculaire aliphatique insaturé en C40 : le phytoène d'où découlent tous les caroténoïdes (Böger et Sandmann, 1998). Pour obtenir ces molécules fonctionnelles, le phytoène (aliphatique), va acquérir en plusieurs étapes des doubles liaisons nouvelles grâce à diverses désaturases, puis les deux extrémités de la chaîne aliphatique vont se cycliser (1 cycle à 6 carbones à chaque extrémité) (Breitenbach et al., 2002 ; Simkin et al., 2003 ; Di Baccio et al., 2002 ; Umeno et al., 2005) pour donner les carotènes et caroténoïdes physiologiquement actifs (figure II, 2).

Les inhibiteurs connus agissant sur cette voie de biosynthèse conduisent à ce que les feuilles formées après le traitement soient totalement dépigmentées (d'une part, du fait de la non synthèse des caroténoïdes et, d'autre part, par photo-destruction des chlorophylles [dont la biosynthèse n'est pas affectée], mais qui n'ont plus de protection anti-oxydante normalement assurée par les caroténoïdes). Structuellement les inhibiteurs classiques de la biosynthèse des caroténoïdes ne font pas partie de grandes familles chimiques (telles les carbamates, les s-triazines ou les phénylurées) et n'ont pas été découverts à la même époque. Le premier apparu sur le marché est l'aminotriazole ou amitrol (1953). C'est bien plus tard que sera trouvé son mode d'action sur la lycopène cyclase et sur différentes désaturases. La clomazone agit, elle aussi, sur cette voie des isoprénoïdes sans que l'on sache encore actuellement de manière très précise quel est son site d'action. En 1968 apparaît le norflurazon, (Keeling et al., 1989 ; Ouzna et al., 2009 ; Sandmann, 2009) molécule emblématique de l'inhibition des caroténoïdes. Son site d'action bien décrit dans la littérature correspond à la phytoène

désaturase (Poovey et al., 2004) Cette cible sera aussi celle de deux autres molécules commercialisées : la flurochloridone (apparue en 1982) et le diflufénicanil (apparue en 1985). Dans nos essais, le norflurazon servira de référence pour un mode d'action typique sur la voie des caroténoïdes.

La recherche d'un effet de l'aclonifen sur la biosynthèse des caroténoïdes a été menée en comparaison avec les résultats obtenus avec le norflurazon, inhibiteur de la phytoène désaturase conduisant à l'accumulation aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité de la molécule de phytoène identifiable, après extraction, par spectrophotométrie et par chromatographie.

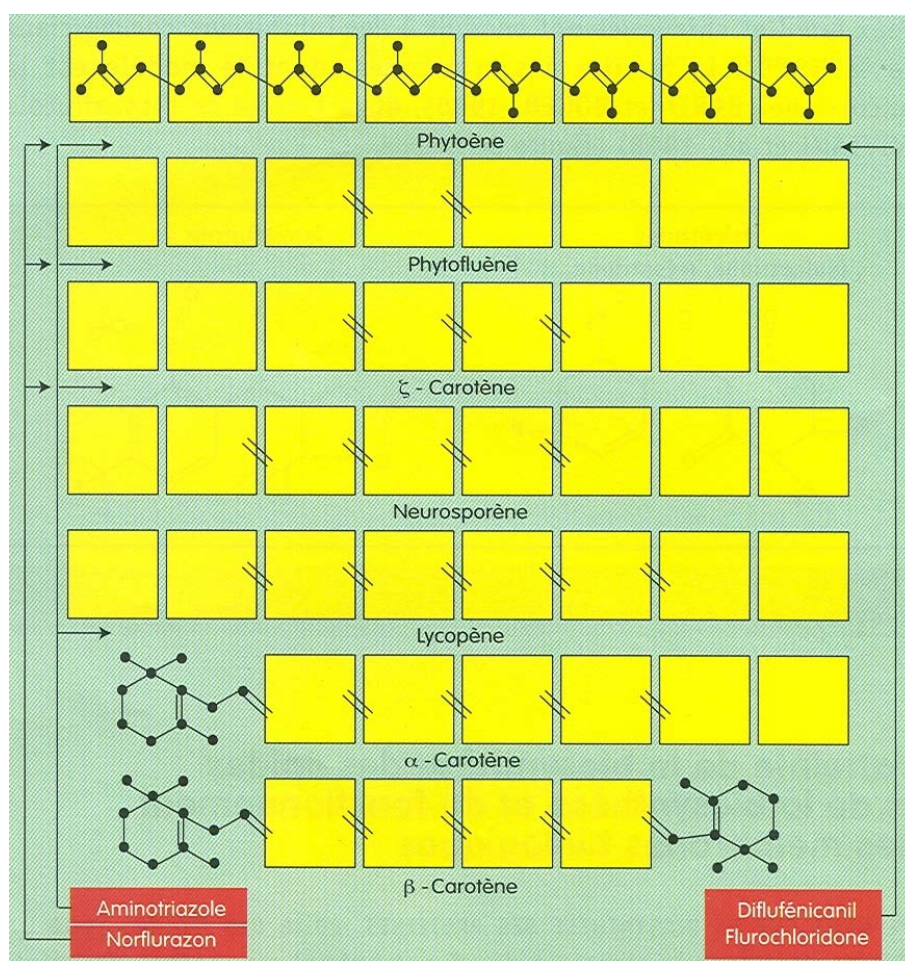


Figure II, 2 : La voie de biosynthèse chloroplastique des caroténoïdes à partir du phytoène (acquisition de plusieurs doubles liaisons et cyclisation terminale) et niveaux d'action inhibitrice de cette voie par quelques herbicides (d'après Tissut et al., 2006).

C) Matériels et méthodes : (Pour préciser les modes d'action herbicides de l'aclonifen.)

Les expériences ont été conduites sur différentes plantes (maïs, blé, concombre (*Cucumis sativus*). Les semences traitées brièvement par une solution aqueuse de Javel (0,5%), sont abondamment lavées à l'eau et mises à gonfler dans l'eau pendant 8 h. Après imbibition des

semences, celles-ci sont plantées dans des pots en plastique noir (200 ml) sur du sable abondamment lavé et débarrassé des particules les plus fines. Le sable propre et sec est arrosé avec les solutions de traitement jusqu'à obtenir une « capacité au champ ». L'eau de traitement pour le sable est additionnée d'herbicide (solutions mères dans l'éthanol ou le DMSO) pour atteindre des concentrations finales dans l'eau comprise entre $[5.10^{-7}\text{M}]$ et $[5.10^{-4}\text{M}]$ (limite de solubilité dans l'eau). L'apport de solvant dans les solutions aqueuses ne dépasse pas 1% pour ne pas freiner la croissance des plantules. Les solutions herbicides sont à base d'aclonifen, d'acifluorfen et de norflurazon. Les cultures durent de 7 à 21 jours à 24°C le jour (16h) et 18°C la nuit (8h). La biosynthèse des caroténoïdes n'étant pas photo-dépendante, les expérimentations portant sur la voie des isoprénoïdes et son blocage sont conduites sur des plantules cultivées dans les mêmes conditions que celles indiquées ci-dessus mais à l'obscurité complète afin d'éviter la présence des pigments chlorophylliens dans les extraits foliaires.

1) Détermination des ROS (Reaction Oxygen Species) produits dans les feuilles.

Le processus photodépendant de toxicité des DPE conduit à la génération abondante d'oxygène actif non contrôlée par les mécanismes biochimiques cellulaires. Pour la détermination, dans les feuilles, d'espèces actives d'oxygène, nous avons utilisé le colorant à propriétés rédox : le NBT (nitrobleu tetrazolium, Sigma, France) selon la méthode de Hoffmann et al. (2005). Les plantes cultivées en chambre conditionnée (blé, maïs) sont infiltrées sous vide avec une solution tampon phosphate (phosphate-buffered saline : PBS, Amersham, France) additionnée de 6 mM NBT durant 20 minutes. Les feuilles traitées sont éclairées pendant 5 minutes (lampe halogène Osram, HLX64653, 24 V, 250 W, $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pour visualiser dans les feuilles le formazan (forme réduite du NBT), les chlorophylles doivent être au préalable éliminées par un mélange EtOH/ CHCl_3 (4/1 : v/v) additionné de 0,15% d'acide trichloracétique. Les plantes décolorées sont alors immergées dans un mélange d'eau et de glycérine (1/1 : v/v) pour observation microscopique. Pour quantifier la réduction du NBT, 1 g de matériel décoloré est broyé dans 500 μl de KOH 2M et 750 μl de DMSO. Cette méthode permet de stabiliser le formazan. La solution obtenue est bleue-turquoise et peut être dosée par spectrophotométrie à 630 nm. L'analyse statistique est effectuée par utilisation du test Mann-Whitney's U ($p < 0,05$)

2) Mise en évidence d'un effet DPE de l'aclonifen sur cotylédons de concombre.

L'effet des DPE (perte des chlorophylles par blocage de la protoporphyrinogène oxydase) est visualisé classiquement sur des fragments chlorophylliens prélevés sur des feuilles

cotylédonaire de concombres cultivés à la lumière (matériel biologique particulièrement sensible). Les cotylédons sont obtenus au laboratoire. Des graines de concombre sont semées en chambre conditionnée (24°C, 80-90% d'humidité relative sous éclairage artificiel ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16h d'éclairage/jour). Après 12 jours de culture les cotylédons sont de tailles adultes et fortement chlorophylliennes. Des fragments de 1 cm^2 sont découpés dans ces cotylédons séparés au préalable de la plantule. Pour éviter les pertes d'eau, les fragments sont déposés dans une boîte de Pétri avec couvercle dont le fond est recouvert de papier humide. Des solutions aqueuses (20 ml) des différents herbicides à tester sont préalablement préparées ($[5.10^{-5}\text{M}]$ d'aclonifen, d'acifluorfen, de norflurazon) sont disposées dans des boîtes de Pétri prévues à cet effet. Afin de faciliter la pénétration et la diffusion interne des molécules étudiées, les fragments cotylédonaire sont immergés dans les solutions contenues dans les boîtes de Pétri. Ces boîtes sont entreposées dans un récipient au sein duquel on peut appliquer durant 20 minutes un vide modéré. Les solutions aqueuses rentrent alors facilement par les sections des fragments dans les espaces atmosphériques de la feuille cotylédonaire (environ 30% de l'espace foliaire). Comme l'effet des DPE est photodépendant, une partie des fragments traités est mise à la lumière de la chambre conditionnée, une autre partie « témoin » est mise à l'obscurité.

D) Résultats

1) Comparaison aclonifen/acifluorfen sur blé (figure II, 3)

Avec les deux DPE de traitement (culture à la lumière), nous observons une diminution de la taille des feuilles des plantes (environ 35-40%) et la teneur en eau des feuilles, supérieure à 90% dans les témoins, est inférieure à 80 % après traitement à l'aclonifen et, enfin, 70% après traitement à l'acifluorfen. La présence de nécroses foliaires avec l'acifluorfen, voies ouvertes à des pertes d'eau non contrôlées, semble être l'explication la plus plausible pour interpréter cette différence. Ces nécroses apparaissent préférentiellement dans le 1/3 inférieur des feuilles.

Au niveau du contenu pigmentaire (figure II, 3), les résultats montrent une baisse sensible des concentrations foliaires. Avec l'aclonifen [10^{-4}M], la teneur en chlorophylle totale (a et b) chute de 78% ainsi que celle des caroténoïdes (80%). En ce qui concerne les contenus en chlorophylle, la situation obtenue avec l'acifluorfen (herbicide de référence sur la synthèse des chlorophylles) est proche de celle observée avec l'aclonifen (peu de traces de chlorophylle détectées : chute de 55% de l'ensemble des chlorophylles). Par contre, avec le DPE de référence, la synthèse des caroténoïdes n'est pratiquement pas atteinte (30%). Avec le

norflurazon [10^{-4} M] comme témoin de l'inhibition des caroténoïdes la situation est la suivante : diminution de 95% de la synthèse totale des chlorophylles, et décroissance de plus de 99% des caroténoïdes, la disparition de ces derniers composés expliquant l'absence quasi complète des chlorophylles (phénomène de « »bleaching« »).

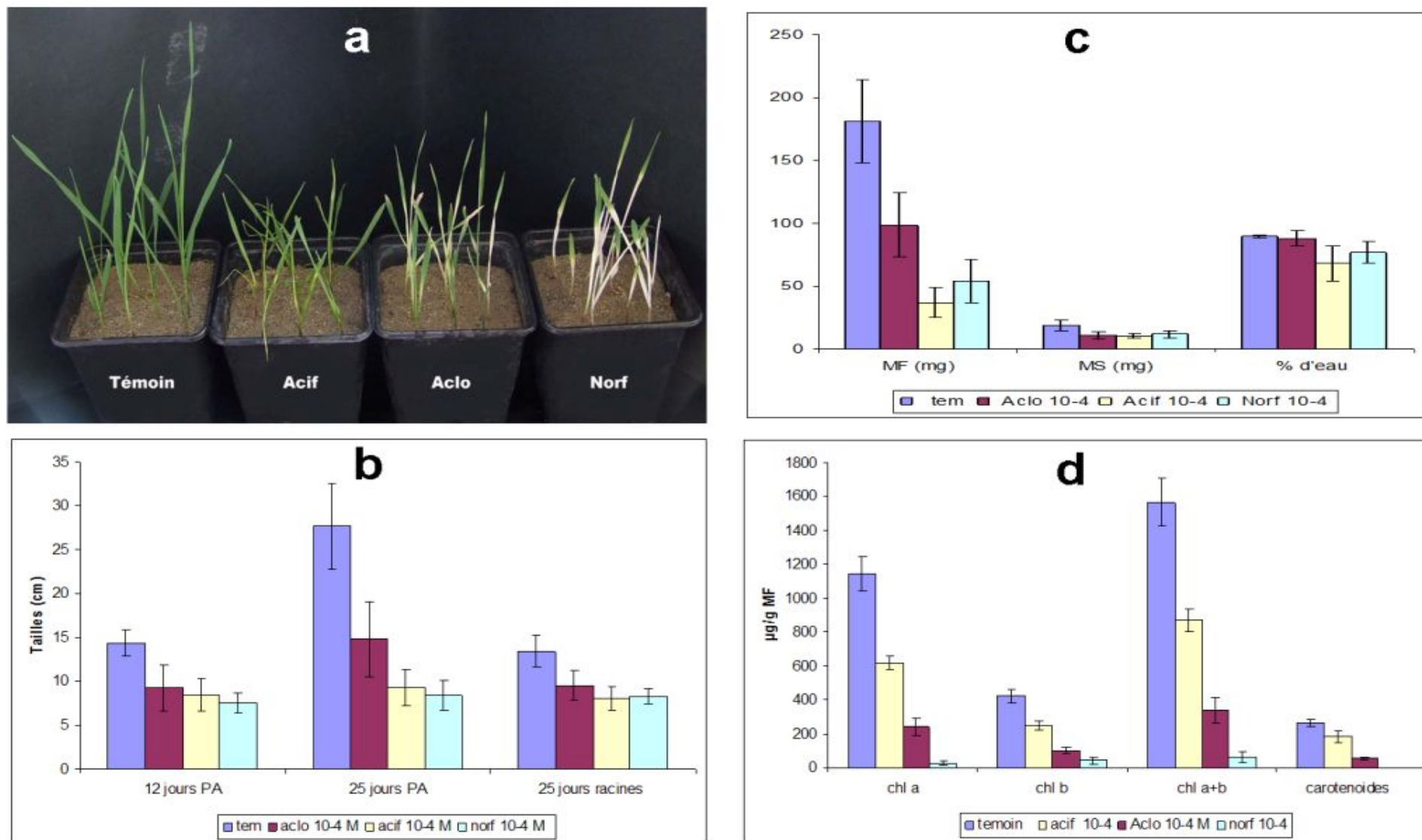


Figure II, 3 : Effet de l'aclonifen, de l'acifluorfen et du norflurazon sur plantules de blé âgées de 12 jours : a et b : taille des plantes, teneur en eau, teneur en chlorophylles a, b et totales et en caroténoïdes. Les concentrations en herbicides sont de $[10^{-4}\text{M}]$.

2) Mise en évidence d'un effet de l'aclonifen sur la biosynthèse des caroténoïdes.

Les résultats présentés concernent des plantules de blé (figure II, 4) mais ceux obtenus avec des plantules de maïs sont assez largement semblables (non montrés). Les semences de blé cultivées comme témoin à l'obscurité donnent des plantes étiolées (figure II, 4a), aux feuilles allongées sans traces de chlorophylles mais bien pourvues en caroténoïdes (couleur jaune-orangée). En effet, la biosynthèse des caroténoïdes n'est pas dépendante de la lumière contrairement à celle des chlorophylles (Sandmann and Albrecht, 1990). Sur des plantules étiolées de 9-10 jours, cultivées en présence d'herbicide (figure II 4b) ou non, les feuilles sont prélevées, pesées et broyées au mortier dans l'acétone (3 extractions par échantillon). L'extrait concentré est déposé sur plaque chromatographique (SiO_2 F₂₅₄, EP 40-60°C/acétone 10/3 v/v). Par chromatographie (figure II, 4c) et spectrophotométrie, nous avons identifié chez le témoin le β carotène ($R_f = 0,90$) et les principaux caroténoïdes habituels (lutéine, zéaxanthine, violaxanthine et néoxanthine ; R_f respectivement 0,25 ; 0,17 ; 0,14 ; 0,10).

Chez les plantules précocement traitées par le norflurazon [10^{-4}M] et par l'aclonifen [10^{-4}M] cette synthèse de caroténoïdes est fortement diminuée comme le montre la chromatographie sur gel de silice et les spectres d'absorption des extraits foliaires réalisés dans l'acétone, (figure II, 4). Cette absence de caroténoïdes se traduit par un changement de couleur des feuilles étiolées qui deviennent complètement blanches, le témoin restant orangé. Avec le norflurazon, la concentration déclenchant les symptômes est de [$5 \cdot 10^{-6}\text{M}$]. Une concentration plus élevée, de [10^{-4}M] est nécessaire avec l'aclonifen, ce dernier se caractérisant par une migration xylémienne supposée assez lente (interprétation des résultats concernant l'apparition des symptômes). Les quantités d'aclonifen nécessaires pour obtenir l'effet mettent assez longtemps à rejoindre les sites de biosynthèse des pigments ce qui explique que les parties sommitales des feuilles (les premières formées lors de la croissance des feuilles de graminées) échappent au traitement (apex orangé des plantules traitées par l'aclonifen) car ces parties se sont constituées alors que l'herbicide n'avait pas encore pu atteindre la concentration critique dans ces zones pour des raisons de faible mobilité.

A la lecture de l'ensemble de ces résultats, notre travail démontre que l'aclonifen est un inhibiteur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes entraînant une accumulation de phytoène (figure II, 5 b et c). Le phytoène pur n'étant pas commercialisé, l'identification spectrale du phytoène a été effectuée en référence à des spectres témoins publiés par Dahlin and Ryberg (1986). Les quantités de phytoène sont établies d'après la formule de Davies (1976).

$$\text{Amount of carotenoids} = \frac{A(470 \text{ acetone}) \times 1.1 \times 10 \times \text{volume of acetone}}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times \text{weight of leaf}}$$

$$\text{Amount of phytoene} = \frac{A(298 \text{ hexane}) \times 1.3 \times 10 \times A(470 \text{ acetone}) \times \text{volume of acetone}}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times A(470 \text{ hexane}) \times \text{weight of leaf}}$$

Un des sites d'action de l'aclonifen est certainement le même que celui du norflurazon : la phytoène désaturase.

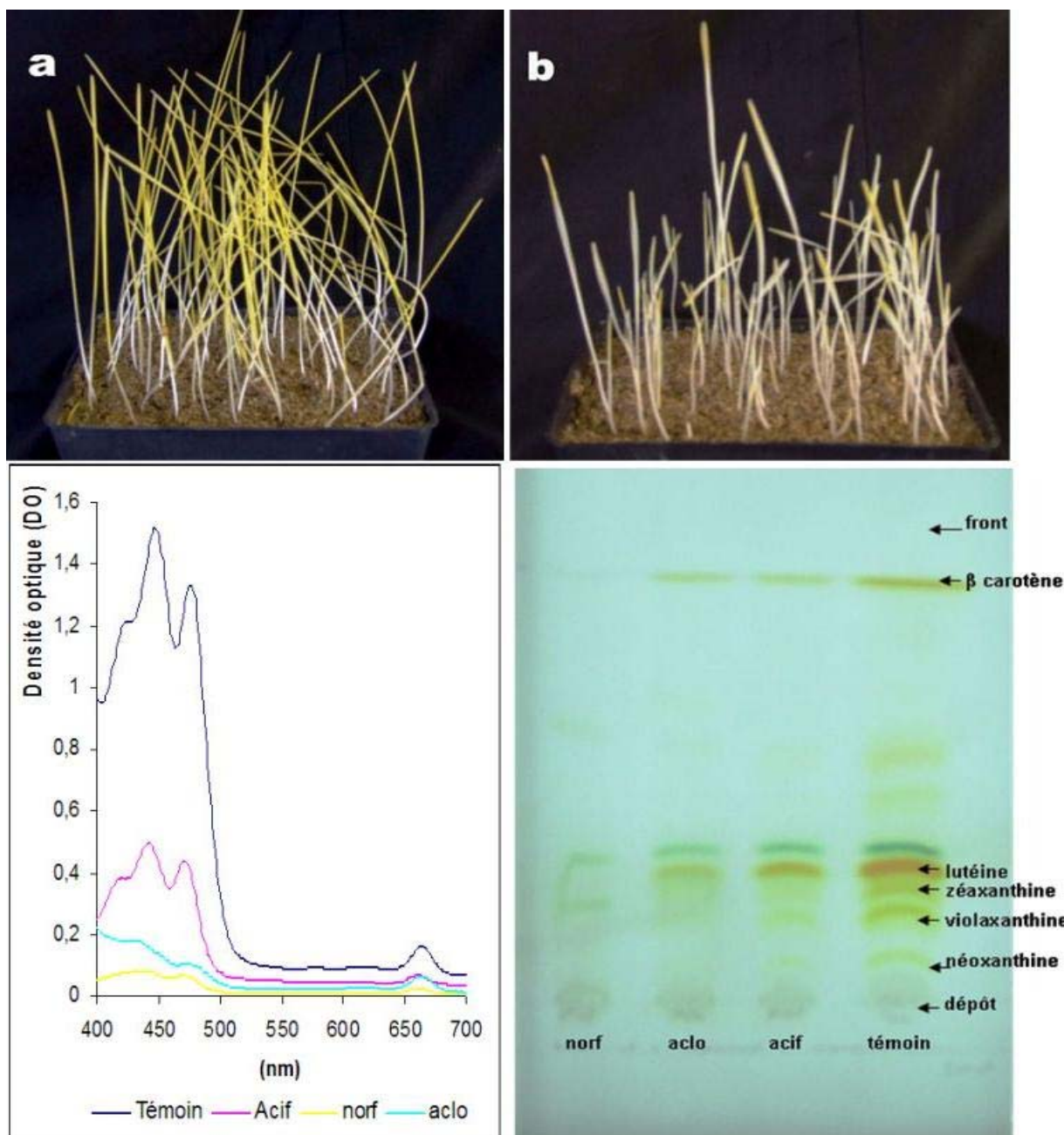


Figure II, 4 : Effet sur la composition pigmentaire de différents herbicides utilisés en traitement racinaire au sein de plantules étiolées de blé (9 jours). a) témoin, b) traitées à l'aclonifen, c) spectres des solutions caroténoïdiques extraites de feuilles témoin et traitées d) chromatogramme sous lumière visible du contenu pigmentaire des feuilles (témoin, traitées à l'acifluorfen [10⁻⁴M] (acif.), à l'aclonifen [10⁻⁴M] (aclo.) et au norflurazon [10⁻⁴M] (norf.)).

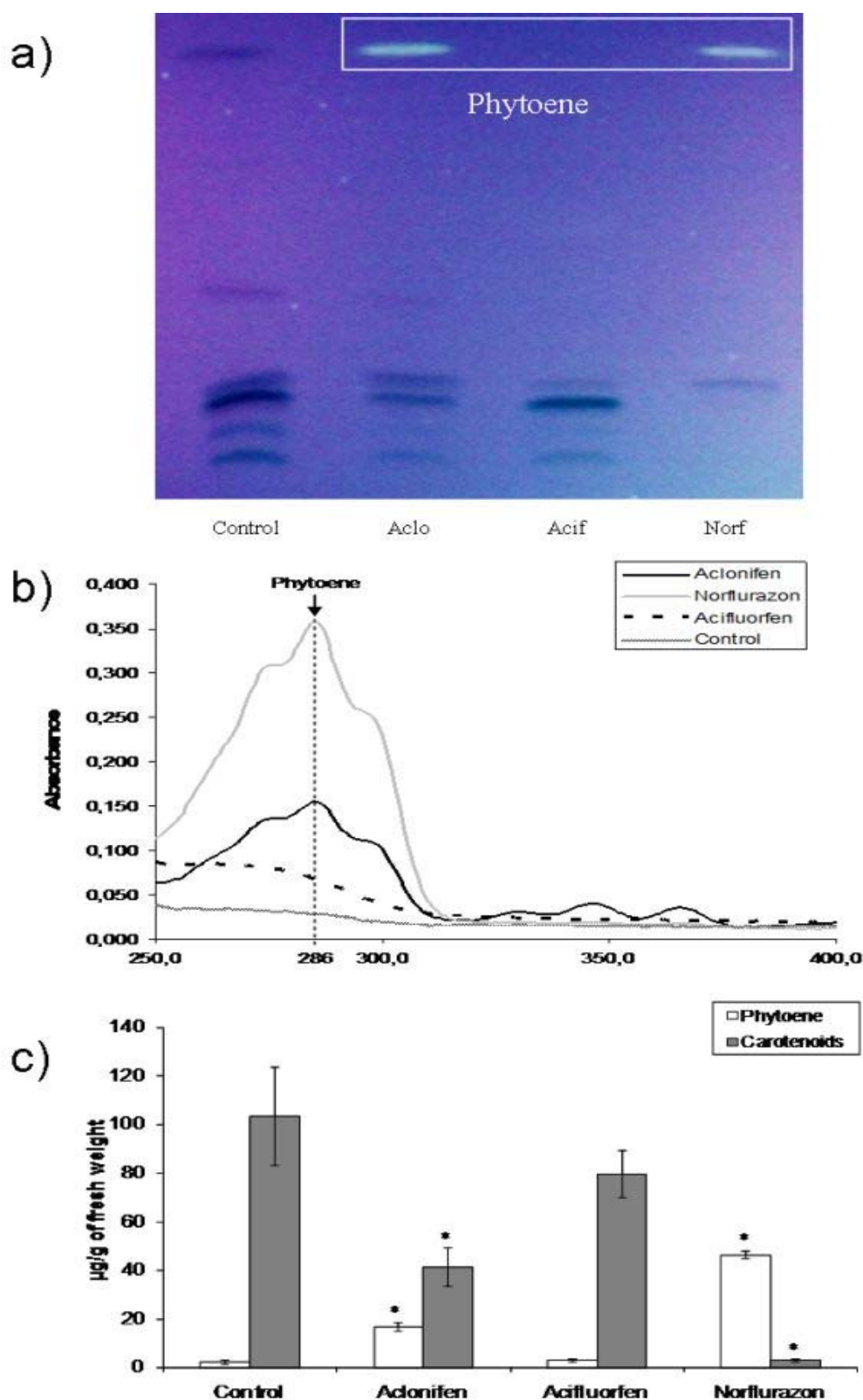


Figure II, 5 : Mise en évidence de l'accumulation du phytoène dans les extraits foliaires de plantules de maïs traitées par le sol a) chromatogramme photographié sous UV 366 (silice F₂₅₄, éther de pétrole/acétone ; 10/3 ; v/v), b) spectres dans l'éther de pétrole de solutions de phytoène (λ_{max} 285 nm) obtenues par chromatographie et solubilisation dans l'EP du spot chromatographique obtenu en a, et, c) contenus totaux de phytoène et de caroténoïdes chez le témoin et les essais aclonifen et acifluorfen ($\mu\text{g/g}$ de masse fraîche).

3) Existence d'un effet de l'aclonifen sur la biosynthèse des chlorophylles/cytochromes.

Le « test concombre » (Kenyon et Duke, 1985 ; Routaboul et al., 1990) permet de visualiser la destruction membranaire photo-dépendante dans des échantillons cotylédonaire suite au blocage de la protoporphyrinogène oxydase chloroplastique. Cette destruction s'exprime de manière très forte dans ce type de matériel ce qui suppose une capacité de biosynthèse de chlorophylles extrêmement forte dans ce type d'organe, caractère que l'on suppose associé à une très grande sensibilité de ce type de matériel vis-à-vis de l'anion superoxyde. Sur ce test, l'effet de type DPE se caractérise 1) – par une destruction des chlorophylles préexistantes au traitement, et, 2) – par une destruction des membranes biologiques (en commençant par celles du chloroplaste) se traduisant rapidement par la mise en place d'un système nécrotique des échantillons atteints. Ces deux effets sont strictement dépendants de la lumière à haute énergie ce qui différencie fondamentalement ce test de celui présenté ci-dessus pour la mise en évidence d'une inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes, cette dernière ne dépendant absolument pas de la lumière. Sur fragments de cotylédons de concombre, la substance de référence : l'acifluorfen utilisé à $[5.10^{-6}M]$, déclenche cet effet nécrotique, à la lumière, en moins de 24 h. Cet effet ne fait qu'empirer par la suite. L'aclonifen est moins rapide et semble moins efficace que l'acifluorfen, cependant à $[5.10^{-5}M]$, après 36h d'exposition il donne les mêmes résultats et les mêmes symptômes. A 64h l'effet herbicide est totalement atteint, les fragments cotylédonaire sont complètement déliquescents (figure II, 6). Par contre, dans chaque cas d'échantillons maintenus à l'obscurité, l'intégrité cellulaire et le contenu pigmentaire (chlorophylles et caroténoïdes) sont complètement maintenus. Cela démontre l'effet clairement photo-dépendant des DPE vrais. L'ensemble de nos résultats obtenus sur fragments cotylédonaire de concombre démontre que l'aclonifen se comporte comme un DPE typiquement inhibiteur de la protoporphyrinogène oxydase, ce qui conduit à une accumulation de protoporphyrine IX excitable à la lumière d'où découle une dégradation pigmentaire et membranaire liée à la production de grandes quantités d' O_2^- . Dans les mêmes conditions expérimentales, le norflurazon $[5.10^{-5}M]$ à la lumière n'a aucun effet (figure II, 6).

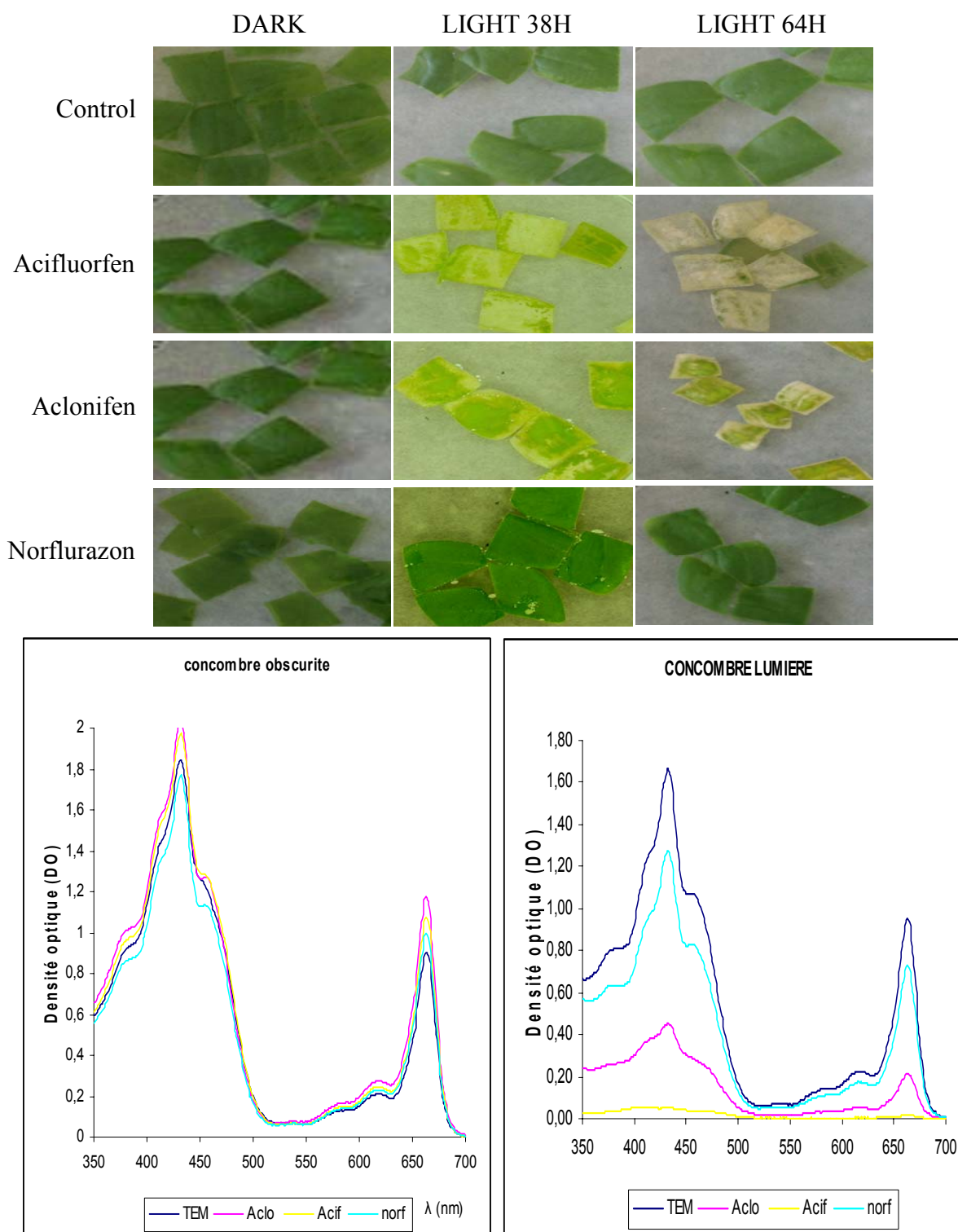


Figure II, 6 : Symptômes de dépigmentation et de nécroses observés à la lumière, sur des fragments cotylédonaire de concombre traités par l'acifluorfen (5.10^{-6} M), norflurazon (5.10^{-5} M) et l'aclonifen (5.10^{-5} M). Comparaison à des témoins et des à fragments traités au norflurazon. Observations après 38 et 64 h d'expérience. Spectres des pigments en situation témoin (obscurité) et en situation éclairée.

4) Mise en évidence du rôle d'une accumulation de la protoporphyrine IX dans les cotylédons de concombre traités à l'acifluorfen et à l'aclonifen.

Nous avons d'abord démontré que de la protoporphyrine IX commercialisée (Sigma-Aldrich, France) solubilisée dans du DMSO à une concentration suffisante pouvait être porteuse de phytotoxicité (mêmes symptômes que ceux visualisés figure II, 6). Pour déterminer la concentration minimale nécessaire à l'induction d'un effet nécrotique photo-dépendant, différentes concentrations de protoporphyrine XI ont été infiltrées sous vide durant 20 minutes dans des fragments de cotylédons de concombre. Après infiltration, les fragments chlorophylliens sont exposés à la lumière ($250 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). Avec ces conditions expérimentales, les cotylédons sont détruits 12 heures tandis que les témoins restent vivants et bien chlorophylliens. L'effet nécrotique est clairement établi avec une dose de protoporphyrine IX de 250 nM.

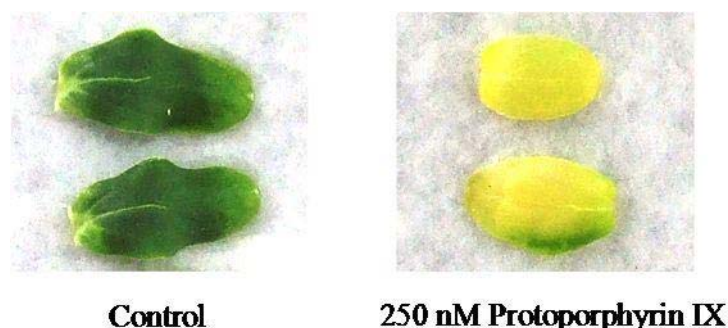


Figure II, 7 : Effet nécrotique photo-dépendant dans des feuilles cotylédonaires de concombre infiltrées avec une solution de protoporphyrine IX exogène. La protoporphyrine est introduite par infiltration sous vide et l'expérimentation se déroule sous lumière intense (photo sous lumière du jour).

Dans des plantes traitées à l'aclonifen, l'accumulation de protoporphyrine IX attendue suite au blocage enzymatique du DPE utilisé a été recherchée. Témoins et fragments traités (2g de masse fraîche) sont extraits à l'aide d'un mélange acétone/ NH_4OH 0,1N (8/1 : v/v) (Walter et Shalygo, 1997). La fraction solide de l'extrait est épuisée par deux autres extractions. La réunion des extraits conduit à une phase hydro-acétonique qui est partagée contre de l'éther de pétrole qui sert à éliminer les acides gras et les lipides extraits. La teneur en protoporphyrine IX contenue dans la phase polaire est établie grâce à un spectrofluorimètre SAFAS (Xénius) (longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement 405 et 633 nm. La figure II, 8 démontre la présence d'une forte accumulation de protoporphyrine chez les cotylédons traités à l'aclonifen [10^{-4}M]. Cette accumulation est aussi forte que celle obtenue à la même concentration de traitement avec l'acifluorfen. Le contenu en protoporphyrine IX des fragments cotylédonaires est de $62 \text{ ng/g} \pm 1,56$ de masse fraîche. Les symptômes de l'effet herbicide sont obtenus avec une quantité de protoporphyrine IX quatre fois moins forte qu'avec la protoporphyrine commerciale.

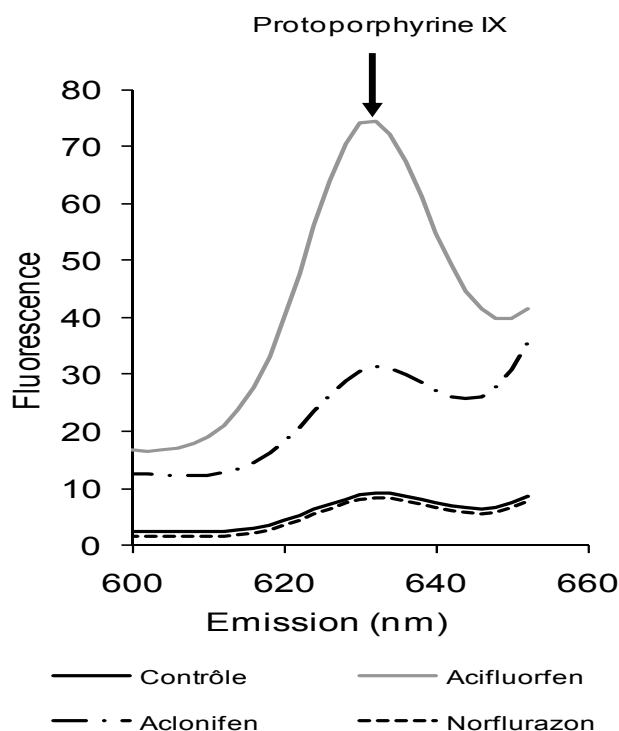


Figure II, 8 : Détermination fluorométrique de l'accumulation de protoporphyrine IX dans des plantules de maïs étiolées et traitées soit par de l'acifluorfen [10^{-4} M] soit par de l'aclonifen [10^{-4} M]. Témoin et plantes traitées sont extraits par un mélange acétone/ NH_4OH 0,1 N/ H_2O (8/1/1 : v/v/v). La protoporphyrine IX est extraite par de l'éther de pétrole pour éliminer la fraction lipophile. Le contenu en protoporphyrine est mesuré par spectrofluorimétrie (excitation 405 nm et émission 633 nm). Une solution témoin titrée à 46,1 nM en protoporphyrine IX (PPIX est utilisée pour calculer les concentrations dans les feuilles des plantes traitées).

Pour compléter ces observations, des plantules étiolées de blé traitées à l'aclonifen [10^{-4} M] montrent aussi une forte accumulation de protoporphyrine IX qui atteint 156 ng/g de feuilles fraîches. Une partie de ces plantules étiolées est alors exposée à la lumière ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). Très rapidement les symptômes nécrotiques apparaissent tandis que les témoins deviennent chlorophylliens et sont en situation de croissance.

5) Démonstration de la production de ROS induite par la lumière dans du maïs traité par de l'aclonifen ou de l'acifluorfen

La conséquence de l'accumulation extra chloroplastique de protoporphyrine IX à la lumière après traitement par un diphényléther, conduit à une production abondante et non contrôlée d'espèces réactives d'oxygène. Cette production de ROS peut être visualisée par microscopie et quantifiée par spectrophotométrie. Les résultats obtenus sur maïs sont rapportés figure II, 10. L'accumulation d'agrégats de couleur noire observables sur les microphotographies des feuilles traitées indiquent la présence de formazan, forme oxydée du NTB sous l'action d'oxygène actif. L'aspect quantitatif de cette oxydation est donné par lecture spectrophotométrique du formazan à 630 nm. Seuls les DPE sont en situation de produire en masse, à la lumière, des formes oxygénées capables de réduire le NTB (essai « norflurazon » identique au témoin).

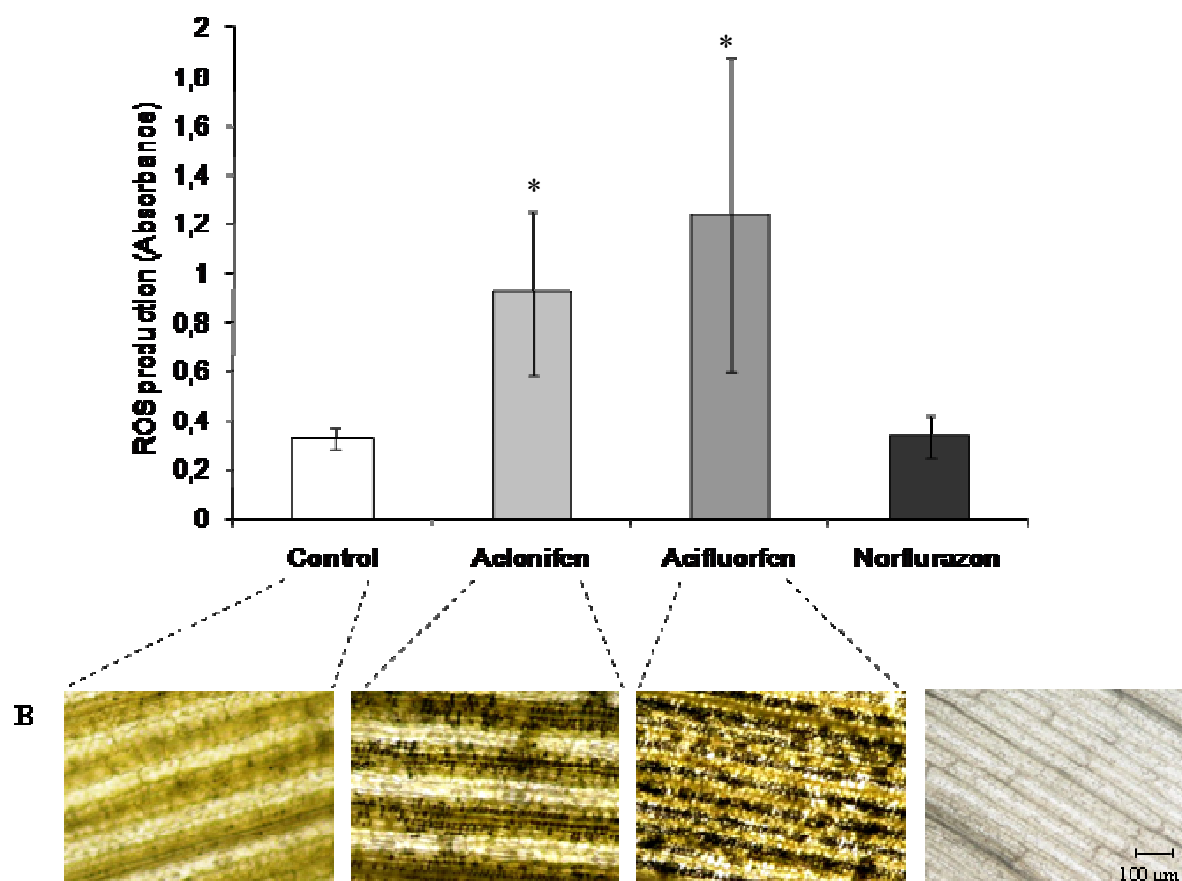


Figure II, 9 : Démonstration de la production de ROS à la lumière chez des plantules de maïs traitées à l'aclonifen et à l'acifluorfen. Témoins et plantes traitées ont été cultivées 7 jours à l'obscurité, à 24°C., puis infiltrés sous vide avec une solution de NTB (6 mM). La production du produit réduit (le formazan) est visualisée par microscopie (B : agrégats noirs) et quantifiée (A) par spectrophotométrie à 630 nm. Les résultats présentent les moyennes \pm SEM de trois expérimentations (Mann-Whitney's U-test (#, $p < 0,05$).

6) Commentaires sur les symptômes de dépigmentation et nécroses.

Les bases biochimiques établies ci-dessus démontrent que l'aclonifen est un **herbicide à double effet très marqué**. Il était nécessaire de comprendre si, au sein de la même plantule en croissance, ces deux modes d'action pouvaient ou non s'exprimer en même temps. Dans les plantules étudiées de blé mais aussi de maïs, les symptômes de dépigmentation qui s'expriment à l'obscurité et de ce fait ne concernent que les caroténoïdes, ont toute chance de s'exprimer aussi à la lumière. Ceci explique pourquoi, à la lumière, après blocage de la synthèse des caroténoïdes, une destruction des molécules de chlorophylles soit aussi exprimée avec facilité. En effet, ces dernières ne sont plus protégées des oxydations photo-dépendantes (cette protection constitue un des rôles majeurs des pigments caroténoïdiques présents dans les antennes collectrices d'énergie lumineuse au sein du thylacoïde). Dans ces conditions, la différence de symptômes entre une action simple sur la biosynthèse des caroténoïdes et une

action double caroténoïdes et blocage des chlorophylles associé à une production d'anions superoxyde, explique l'apparition d'une dépigmentation totale dans les deux cas suivie d'un effet nécrotique marqué dans le deuxième cas. En présence d'un DPE qui s'exprime sur la biosynthèse des chlorophylles (comme c'est le cas de l'acifluorfen), les effets nécrotiques apparaissent rapidement à la lumière intense. L'expérimentation présentée ici suggère que **l'aclonifen possède deux modes d'action distincts qui s'expriment à des concentrations critiques très similaires** à l'intérieur de la plantule. Parmi les plantes cultivées utilisées dans cette étude seule la plantule de tournesol déroge à cette règle. Cette particularité nette de comportement du tournesol vis-à-vis de l'aclonifen laisse un large espace de sélectivité à cette espèce végétale d'intérêt agronomique. L'approche physiologique de cette sélectivité sera l'objet du chapitre 6. Parmi les plantes sauvages utilisées, la lignée indéterminée de morelle noire utilisée semble posséder, elle-aussi, un grand espace de sélectivité à l'égard de l'aclonifen.

C) Discussion :

L'aclonifen utilisé sur différentes plantules (blé, maïs, concombre, carotte), présente deux modes d'actions très différentes qui s'expriment à des concentrations internes très proches. Cet herbicide est à la fois inhibiteur dans la même organelle, de la synthèse des chlorophylles et de celle des caroténoïdes. Eventualité d'une réelle synergie est actuellement sans démonstration satisfaisante : car le concept de synergie suppose une additivité des effets qui reste, dans notre cas très ambiguë. Il suffirait que dans ces plantules, le contrôle et la dégradation des anions superoxyde par des activités enzymatiques de type SOD (superoxyde dismutase) et/ou catalase, soient assez puissantes pour que l'effet DPE devienne mineur par rapport à l'effet sur l'autre cible.

L'ensemble de nos résultats donne des informations supplémentaires sur le DPE de référence utilisé classiquement sur la biosynthèse des chlorophylles : l'acifluorfen. Cette molécule n'est pas sans effet sur la biosynthèse des caroténoïdes (figure II, 5C). Cette observation mérite d'être vérifiée non seulement pour cette molécule de référence mais ainsi pour l'ensemble des DPE commerciaux. On peut raisonnablement envisager l'hypothèse que l'inhibition de synthèse des caroténoïdes thylacoïdiens soit une cause très forte de l'augmentation de la sensibilité des membranes concernées vis-à-vis d'O₂·-. En effet, un des rôles joués par l'accumulation des caroténoïdes consiste à maintenir un pouvoir réducteur très fort protégeant des oxydations la chlorophylle et donc des dégâts dus aux espèces radicalaires. Si tel est bien le cas, il serait intéressant de suivre les cinétiques de destruction nécrotique des membranes

(accélération des pertes d'eau liée aux zones nécrotiques, production du marqueur de stress oxydatif qu'est le malondialdéhyde – $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$...) en présence ou non de norflurazon.

Si, selon toute vraisemblance, les deux modes d'action s'expriment en toute indépendance et pour des concentrations critiques internes voisines, cela suggère que l'apparition de lignées d'adventices résistantes sur une des deux cibles biochimiques atteintes par l'aclonifen est très largement improbable. Seule une métabolisation puissante transformant l'aclonifen dans des parties non cibles (racines par exemple) paraît la voie permettant à une plante d'avoir une certaine sélectivité vis-à-vis de cette matière active et ainsi d'échapper à son action phytotoxique.

CHAPITRE III : PENETRATION - TRANSFERT DE L'ACLONIFEN DANS LA PLANTE

Nous avons déjà évoqué le fait que des semences au repos étaient pratiquement indestructibles par voie chimique du fait de leur manque d'échanges avec leur milieu. Pour des semences en germination, la situation est toute autre. Par exemple, la vulnérabilité peut être très forte du fait d'échanges faciles entre l'eau contaminée par des inhibiteurs de la division cellulaire, les méristèmes primaires de racine et de tige étant très proches des sources de contamination. C'est le cas avec les nitroanilines comme la trifluraline (Lignoski et Scott, 1972) ou certains phénylcarbamates (Hepler et Jackson, 1969 ; Bartels et Hilton, 1973) « antigerms » (ex. le prophame (Holmsen et Dan Hess, 1985) et le chlorprophame (Sumida et al., 1977)), la circulation de l'inhibiteur se réalise, de cellule à cellule par un mouvement de partition/diffusion, vers l'espace cible proche.

A des stades de croissance plus avancés chez les végétaux, la situation sera bien différente, le développement des racines, des feuilles, voire des tiges peut conduire à un éloignement des espaces cibles par rapport à la source de contamination. La taille et la masse du végétal augmente avec le temps ce qui influe grandement sur la distribution de la molécule herbicide : 1) la quantité d'herbicide nécessaire pour tuer la plante augmente considérablement, 2) la distribution de l'herbicide dans la plante, par le simple jeu de la partition et diffusion, est trop lente pour permettre de saturer rapidement les cibles biochimiques visées, et, 3) du fait de la différenciation cellulaire, la situation des tissus cibles se modifie.

Dans ce contexte, l'efficacité d'un certain nombre d'herbicides va dépendre de la possibilité de la plante de déplacer la matière active à grande distance et aussi rapidement que possible (Ashton et Crafts, 1981). Pour ce faire, l'herbicide doit utiliser les voies de transfert à grande distance mises en place au cours de l'évolution des végétaux : la systémie xylémienne par le bois et/ou la systémie phloémienne par le tissu libérien (Jachetta et al., 1986). Le sens du transfert de la systémie xylémienne est vectoriel - des poils absorbants des racines vers les organes de transpiration : les feuilles -, et, le sens du système phloémien qui va majoritairement des feuilles vers les zones de construction du végétal (méristèmes) ou vers des zones de stockage de la matière organique (fruits, graines, rhizomes, tubercules...).

Ces phénomènes de pénétration et de transferts conditionnent la réussite du traitement herbicide qui doit atteindre, dans la zone cible une concentration suffisante (**concentration critique**) pour que cette cible biochimique d'intérêt vital soit bloquée à 100% durant un temps suffisamment long pour provoquer la mort de l'individu contaminé.

I) Pénétration- transfert : le cas de la plantule de blé.

Lors de cette première expérimentation concernant la mobilité dans la plante nous avons cherché à caractériser les phases de pénétration et de transfert de l'aclonifen utilisé en traitement de sol, dans des plantules de blé cultivées durant 4 semaines sur un support sable à comportement supposé neutre vis-à-vis de l'adsorption de la matière active. Grâce à l'utilisation de la molécule marquée au ^{14}C comme unique apport de matière active dans l'eau de traitement nous avons pu utiliser des doses faibles sans action physiologique apparente sur les plantes mais facilement quantifiables par scintillation liquide.

A) Matériels et méthodes.

1) Culture. Les cultures sont réalisées sur sable de rivière lavé 10 fois à l'eau jusqu'à ce que celle-ci soit claire et que le sable soit débarrassé de toutes structures fines. 400 g de sable sec sont mis dans des pots de culture carrés (10 cm /10 cm) en plastique noir. La capacité au champ du dispositif expérimental est voisine de 80 ml/pot.

2) Plantes. Des semences de blé (figure III, 1), désinfectées rapidement dans une solution aqueuse d'eau de Javel (0,2 %), sont abondamment rincées à l'eau puis immergées durant une nuit dans de l'eau ordinaire (phase d'imbibition). 6 semences gonflées sont alors semées en surface de chaque pot.

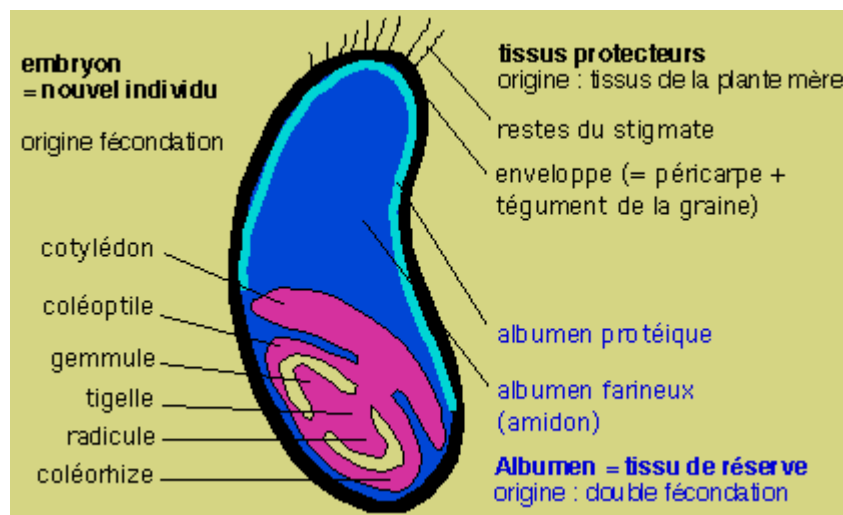


Figure III, 1 : Structure d'un caryopse de blé avant germination.
(d'après <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/bleaupain/ble/01ble.htm>)

3) Traitement. Chaque pot traité reçoit 80 ml d'une eau additionnée de 2.000.000 dpm d'aclonifen marqué (solution à la concentration de 250 nM), soit 20 nmoles ou 5,3 µg/pot. Afin de mesurer au cours du temps l'évaporation du système, un pot sans plantule ni aclonifen sert de témoin. Tous les deux jours chaque pot est pesé. Les pertes d'eau mesurées sont alors compensées. La différence entre évapo-transpiration et évaporation seule correspond à la transpiration des plantules au cours du temps.

4) Conditions de culture. Les cultures sont conduites durant 4 semaines en salle conditionnée (16h de jour, 8h de nuit, H.R. de 80%, 24°C le jour et 18°C la nuit). 4 pots supportent les cultures de blé et ont été utilisés respectivement à 7 jours (T1), à 14 jours (T2), à 21 jours (T3) et à 28 jours (T4).

Expérimentation. A chaque temps indiqué, un pot est utilisé. Une des 6 plantules est prélevée pour une visualisation *in situ* par Phosphorimager (Phosphorimager, Imaging System Cyclone, Perkin Elmer) du positionnement de la radioactivité dans l'ensemble de la plante. Les 5 plantules restantes sont prélevées à leur tour, disséquées suivant les différents organes : restes de la semence, coléoptiles, racines, feuilles. Après des mesures biométriques (masses fraîches, longueurs, surfaces foliaires...), les organes similaires provenant des 5 plantules sont réunis, pesés, broyés dans de l'éthanol afin de mesurer la radioactivité contenue par organe. Chaque échantillon est broyé en présence de sable de Fontainebleau (1 g) dans de l'éthanol (épuisement par 3 extractions successives pour un volume total par échantillon de 5 ml de solvant). Ces 5 ml de solvant sont centrifugés pour séparer le surnageant des débris cellulaires et soumis à un comptage direct par scintillation liquide. Après cette triple extraction éthanolique, le culot de débris cellulaires centrifugé est dépourvu de radioactivité détectable. Pour mesurer la radioactivité présente aux différents temps de prélèvement dans l'eau du substrat, celle-ci est récupérée par aspiration sous vide modéré.

B) Résultats.

1) Cinétique de croissance des plantules. La figure III, 2 présente l'évolution de la masse fraîche totale d'une plantule durant la période de 4 semaines de culture. Cette évolution est régulière sur cette période. Le gain de masse moyen est de 16,4 mg/j/plantule. L'apparition de la première feuille se situe le 2^{ème} jour, la deuxième au 9^{ème} jour et la 3^{ème} au 19^{ème} jour. Les plantules traitées sont semblables aux témoins indiquant que les faibles doses d'aclonifen radioactif (5,3 µg/pot) n'altèrent apparemment pas le fonctionnement physiologique des plantes traitées. La croissance des plantules de blé (témoins et traitées) apparaît très régulière entre T 7 jours et T 28 jours.

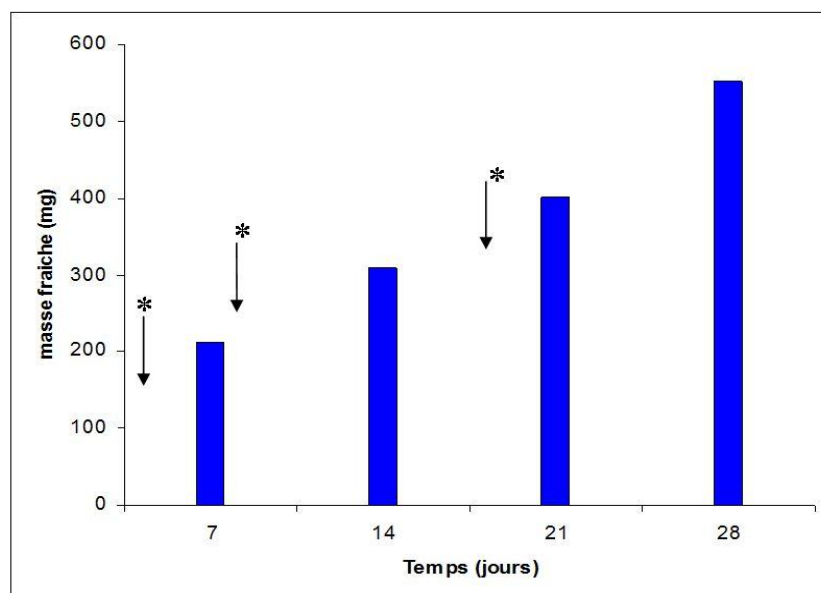


Figure III, 2 : Evolution de la masse fraîche d'une plantule de blé cultivée en salle conditionnée sur sable. Les* correspondent, dans l'ordre, aux dates d'apparition de la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} feuille.

2) Cinétiques de croissance des organes au sein de plantules de blé (résultats présentés pour une plantule : tableau III, 1).

Les cinétiques globales de croissance des plantules entières et des organes sont présentées dans le tableau III, 1. Le gain de masse moyen par plantule (moyenne sur 5 plantules) est voisin de 16,4 mg/j. Les organes évoluent différemment suivant leur rôle. La masse fraîche des semences évolue à la baisse entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour, l'utilisation des réserves pour la néo-formation des feuilles et des racines est traduite par une perte de masse de l'ordre de 30% durant les deux premières semaines. En fin d'expérience, la masse de la graine retrouve une valeur plus conséquente qui s'explique probablement par une hydratation plus forte des composés tégumentaires en voie de minéralisation (apparition de sites d'adsorption de l'eau). Le coléoptile, organe transitoire et de formation très précoce, n'évolue pas en masse (6 mg/coléoptile) au pas de temps de mesure que nous avons choisi. La masse des feuilles est en constante augmentation, elle est de l'ordre de 4,5 mg/j. C'est la croissance racinaire qui, à un rythme très régulier d'une date à l'autre, semble la plus homogène avec un rythme moyen de 10 mg/j soit deux fois le rythme foliaire. A T4 (28 j de culture), les racines représentent la masse la plus importante de la plantule (60%), les feuilles (le stade 3 feuilles par plantule étant atteint) ne comptent que pour 27%, la semence compte encore pour 11% et la masse du coléoptile reste très faiblement représentée (1,3%). Cela signifie que l'effort de biosynthèse est largement orienté durant cette première période de la vie de la plantule vers une production racinaire qui, de fait, se trouvera en contact direct possible avec la matière active du traitement de pré-levée.

Tableau III, 1 : Evolution en masse (exprimée en mg de matière fraîche) des organes d'une plantule de blé durant le 1^{er} mois de culture. Moyenne de l'évolution journalière pour les feuilles et les racines (mg/j) et pourcentage de la masse moyenne de l'organe par rapport à la plante entière à 28 jours. Valeurs issues de la moyenne sur 5 échantillons.

	Masse fraîche à 7 jours	Masse fraîche à 14 jours	Masse fraîche à 21 jours	Masse fraîche à 28 jours	Gain de masse moyen journalier (mg/j)	Masse à T 28 jours (en %)
Racine (mg)	71,2	151	192	278	10	60,4
Coléoptile (mg)	6	6	6	6	-	1,3
Graine (mg)	50,4	34,8	35,4	51,6	-	11,2
Feuille (mg)	56	70,6	91	124	4,5	27
Total (mg)	183,6	262,4	324,2	459,6	16,4	99,9

3) Activité transpiratoire. L'activité de transpiration physiologiquement régulée par les feuilles des plantules a été mesurée par la différence entre l'évapo-transpiration d'un pot contenant des plantules et l'évaporation purement physico-chimique du pot témoin sans plantule. Les valeurs trouvées sont exprimées en ml d'eau transférée par la végétation d'un pot (6 plantules). Durant la 1^{ère} semaine, les pertes transpiratoires sont de 10 ml par pot. Avec l'évolution du nombre de feuilles et leur croissance cette transpiration augmente durant les autres périodes (T1 → T2 17 ml, T2 → T3 73 ml et T3 → T4 65,5 ml). Ainsi, la transpiration globale de 6 plantules en culture sur une période de 4 semaines dans nos conditions, est de 165,5 ml soit 27,7 ml/plantule en 28 jours. Entre le semis et la fin de l'expérimentation, l'évolution moyenne de la surface foliaire par plante est la suivante : à T1 (1 à 2 feuilles) : 2,9 cm² (1,66 ml d'eau transpirée entre T0 et T1) ; à T2 (2 feuilles) : 24,8 cm² (4,8 ml d'eau transpirée entre T1 et T2) ; à T3 (2 à 3 feuilles) : 6,6 cm² (12,16 ml d'eau transpirée entre T2 et T3) ; à T4 (3 feuilles) : 6 cm² (10,91 ml d'eau transpirée entre T3 et T4). La transpiration moyenne par unité de surface en 7 jours est la suivante : entre T0 et T1 de 0,57 ml/semaine/cm², entre T1 et T2 de 0,56 ml/semaine/cm², entre T2 et T3 de 1,84 ml/semaine/cm², entre T3 et T4 de 1,82 ml/semaine/cm². Les deux dernières périodes montrent une très nette augmentation de la transpiration par unité de surface liée à un dysfonctionnement de la régulation thermique de la chambre de culture (température diurne montée à 27°C).

4) Evolution de la concentration interne d'aclonifen (¹⁴C) dans les différents organes de la plantule de blé en croissance.

Les résultats sont exprimés en pmoles/g de matière fraîche (concentration nM) retrouvées aux différents temps de prélèvement (tableau III, 2).

Tableau III, 2 : Evolution en fonction du temps des concentrations internes en aclonifen dans les organes de plantules de blé. Les résultats sont exprimés en pmoles/g de masse fraîche ce qui correspond à des concentrations en [nM].

pmoles/g de masse fraîche	T1 (7 jours)	T2 (14 jours)	T3 (21 jours)	T4 (28 jours)
Racines	224	172	192	170
Graines	236	674	667	529
Coléoptiles	283	1000	1411	1590
Feuilles	116	265	466	555

- La concentration racinaire reste relativement stable par unité de masse au cours du temps, la concentration moyenne étant voisine de 190 nM. La valeur la plus forte (224 nM) est obtenue à T1 (7 jours), alors que les racines dans leur grande majorité sont présentes dans la partie supérieure du pot, là où la concentration en aclonifen dans l'eau doit être légèrement plus forte du fait d'une remontée capillaire de l'eau (et par là même de la matière active solubilisée) liée au phénomène d'évaporation du substrat. D'une manière très globale concernant les concentrations dans les racines de blé, la situation pourrait correspondre à un équilibre de partition et de diffusion classique entre un espace aqueux externe et l'espace racinaire, le niveau de concentration interne dépendant de la concentration disponible dans l'eau libre du substrat.
- La concentration dans les semences varie entre 230 et 670 nM entre les temps T1 et T4 montrant des capacités d'adsorption et/ou d'absorption beaucoup plus fortes que les racines, autre organe directement en contact avec la solution aqueuse de traitement. A T1 la concentration interne à la semence est voisine de celle des racines et de celle de la concentration théorique dans l'eau. Cette situation évolue alors très rapidement entre T1 et T2 montrant que les états d'équilibre par simple diffusion sont dépassés (multiplié par 3). Cela pourrait être expliqué par une destruction progressive des réserves protéiques (l'albumen protéique figure III, 1, composé d'albumines, de globulines, de gliadines et glutélines pour l'essentiel) et amylacées rendues plus accessibles à la solution aqueuse de traitement et à des liaisons nouvelles, en particulier sur les protéines lipophiles et les composés tégumentaires. La dégradation progressive de telles protéines libérerait de nouveau la matière active en solution aqueuse (situation à T4).
- La concentration interne du coléoptile, dont la masse n'évolue pas entre T1 et T4 (6 mg de masse fraîche), augmente très fortement (+ 560 %) en 3 semaines. Cet organe de très faible taille (environ 1,8 cm de hauteur), est en contact direct par sa base avec la solution du substrat mais est situé dans le compartiment atmosphérique et, de ce fait, est en situation de

perdre de l'eau facilement par évaporation (pas de protection cuticulaire), en concentrant ainsi, au cours de sa vie brève, une part de la matière active présente dans l'eau du sol. La situation du coléoptile serait alors celle d'un système chromatographique à eau perdue permettant une accumulation d'aclonifen non volatile. Compte tenu des résultats présentés tableau III, 3, un tel scénario n'apparaît pas déraisonnable et représenterait, pour atteindre ce résultat, une perte moyenne d'eau journalière de 125 µl par coléoptile.

Tableau III, 3 : Estimation des pertes d'eau par des coléoptiles de blé en culture durant 4 semaines, pouvant rendre compte des concentrations en aclonifen mesurées au cours du temps dans cet organe. Les valeurs entre parenthèse correspondent au gain de radioactivité dans le coléoptile d'une date de mesure à l'autre. dpm = désintégrations par minute.

Jours	Radioactivité par coléoptile (dpm)	Radioactivité dans H ₂ O du substrat au temps T (dpm/ml)	Perte d'eau estimée (ml/coléoptile)
T1 (7 j.)	170	410	0,41
T2 (14 j.)	600 (+430)	250	1,72
T3 (21 j.)	850 (+250)	245	1,02
T4 (28 j.)	954 (+104)	270	0,38
			Total : 3,53 ml (soit 125 µl/jour)

- La concentration interne foliaire augmente avec le temps entre T1 (concentration représentant 50% de la concentration interne racinaire) et T4 (augmentation de 475 % par rapport à celle de T1). Les résultats des dosages sont présentés figure III, 3. L'augmentation de la concentration interne foliaire apparaît à peu près linéaire sur la période étudiée et fortement reliée au flux transpiratoire. En effet, les valeurs mesurées directement par contenu de radioactivité extraite des feuilles sont assez bien corrélées avec les valeurs estimées par le calcul (volume d'eau transpirée mesuré multiplié par la concentration de l'eau du sol). Ces valeurs donnant une concentration moyenne dans les feuilles ne préjugent pas de la présence d'un éventuel gradient de concentration à l'intérieur même d'une feuille, gradient qui pourrait s'établir de bas en haut pour le cas où la migration de l'herbicide ne se ferait pas au rythme du transfert de l'eau.

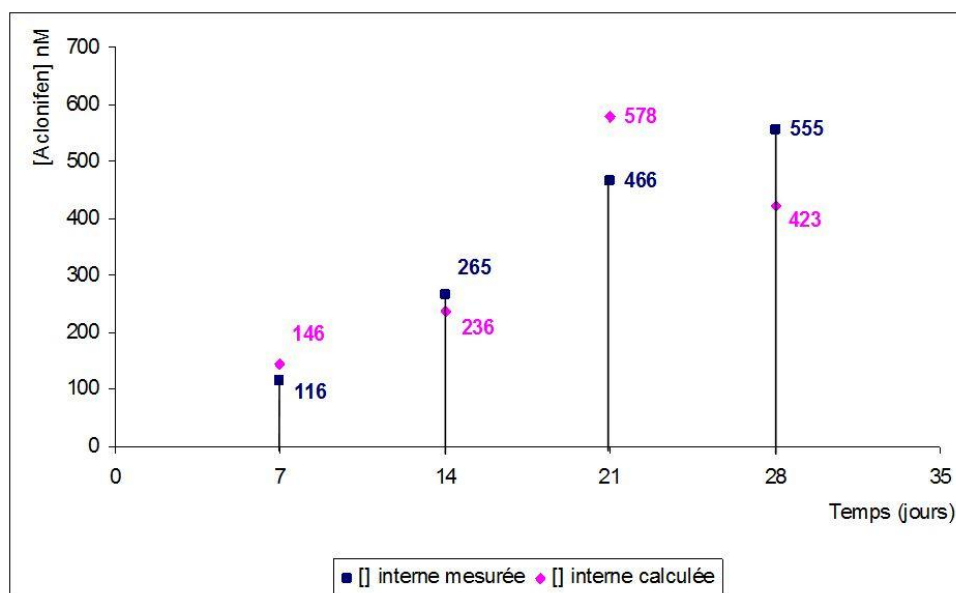


Figure III, 3 : Evolution des concentrations en aclonifen dans des feuilles de plantules de blé au cours d'une culture de 28 jours. Les concentrations sont exprimées en [nM], les valeurs en noir correspondent aux concentrations mesurées et celles en rouge sont des valeurs estimées par le calcul en tenant compte de l'eau transpirée et de la concentration mesurée dans l'eau retenue par le substrat à un instant donné.

- Concentrations réelles dans l'eau du substrat et évolution des facteurs de concentration dans les organes par rapport à la concentration externe en fonction du temps.

La valeur théorique de la concentration en aclonifen dans l'eau du substrat est de [250 nM]. Compte tenu de l'activité spécifique du produit radioactif utilisé seul dans cette expérience, la teneur attendue dans l'eau du substrat sable est de 25 000 dpm/ml (2.000 000 de dpm d'aclonifen ^{14}C dans les 80 ml d'eau mis par pot). La réalité de la teneur en aclonifen par ml d'eau du substrat est très différente montrant que le substrat sable utilisé et considéré comme neutre vis-à-vis de l'adsorption est, *dans cette expérimentation*, en situation d'adsorbant puissant qui diminue fortement la concentration attendue dans l'eau. Les teneurs en radioactivité mesurées à chaque temps de prélèvement sont les suivantes (déjà présentées tableau III, 3) : à T1 : 410 dpm/ml, à T2 : 250 dpm/ml, à T3 : 245 dpm/ml, à T4 : 270 dpm/ml. Ces résultats sont le reflet d'une très grande stabilité au cours du temps de la teneur en aclonifen radioactif dans l'eau de cette expérience (rôle adsorbant du substrat non nul). Ces concentrations réelles dans l'eau du substrat apparaissent ainsi 100 fois inférieures à celles attendues du point de vue théorique. Les capacités adsorbantes de ce sable ne sont pas classiques pour un sable de rivière, ce qui nous fait soupçonner la présence d'un autre composant dans ce substrat (matière organique ou argile). *De ce fait, ce sable (utilisé uniquement dans cette expérience réalisée en début de thèse) n'a plus été utilisé dans la suite*

de nos expérimentations, il fut remplacé par du sable d'origine et de qualité contrôlée et toujours commercialisé par le même magasin. Les tableaux III, 4 et 5 présentent les résultats des équilibres de concentrations obtenus organe par organe et aux différents temps étudiés.

Tableau III, 4 : Radioactivité mesurée dans l'eau du substrat et, après extraction, dans les différents organes de plantules de blé cultivées entre 7 et 28 jours. Les valeurs sont exprimées soit en dpm/ml d'eau soit en dpm/g de masse fraîche.

Jours	H ₂ O	Racine	Graine	Coléoptile	Feuille
T1 (7 j.)	410	22360	23360	28660	15280
T2 (14 j.)	250	17210	67810	100000	30350
T3 (21 j.)	245	19190	66670	141170	46590
T4 (28 j.)	270	17050	52950	159000	54450

Tableau III, 5 : Evolution au cours du temps et organe par organe du facteur de concentration de l'aclonifen. Ce facteur correspond au rapport des concentrations mesurées par g d'organe frais sur les concentrations mesurées par ml d'eau. ($\frac{[interne]}{[externe]}$).

	T1 (7 j.)	T2 (14 j.)	T3 (21 j.)	T4 (28 j.)
Racines	55	69	78	63
Graines	57	271	272	192
Coléoptiles	70	400	576	589
Feuilles	37	121	190	205

Au niveau racinaire, le facteur de concentration entre la phase aqueuse extérieure et le milieu interne racinaire est de l'ordre de 60. Ce facteur est très largement stable au cours du temps. Il pourrait correspondre à un état d'équilibre de simple partition et de diffusion entre un espace aqueux (l'eau du substrat) et un espace racinaire représenté par l'eau interne des racines et leurs espaces lipophiles (membranes lipidiques, cellules de bois lignifiées, mise en place de l'assise subéroïde ...). Avec un log P de l'aclonifen voisin de 3,7 (1 molécule dans l'eau pour 5000 dans une phase lipophile), un espace lipophile racinaire représentant 1 à 1,5% du volume total racinaire suffit à expliquer un facteur de concentration de l'ordre 60.

Au niveau de la semence le facteur de concentration est élevé (270) à T2 et T3, assez fort à T4. Les parties lipophiles susceptibles de concentrer fortement l'aclonifen dans ces organes sont multiples et largement présentes dans les téguments et dans les réserves protéiques de nature lipophile. La valeur assez faible à T1 peut s'expliquer par une certaine hétérogénéité tissulaire de cet organe conduisant à une difficulté de migration de l'aclonifen vers les parties les plus internes de la semence durant la première semaine. Durant la période

entre T1 et T4 les espaces lipophiles deviennent de plus en plus accessibles du fait de l'hydrolyse des réserves et enfin, à T4, le facteur de concentration diminue progressivement au fur et à mesure que les espaces adsorbants se transforment (par hydrolyse par exemple).

Pour les coléoptiles, l'augmentation du facteur de concentration est très forte à partir de la 2^{ème} semaine. Nous avons analysé plus haut cette situation qui peut s'expliquer par un simple mouvement chromatographique ascendant à eau perdue. Une perte moyenne de 125 µl/j/coléoptile suffit pour expliquer les résultats obtenus sur cet organe (sans protection contre les pertes d'eau), en relation directe avec l'eau du substrat et dont l'essentiel se trouve en espace atmosphérique.

Enfin, les contenus foliaires (illustrations par autoradiographie, figure III, 4) et par voie de conséquence les facteurs de concentration de l'aclonifen, semblent tout à fait en accord avec les flux transpiratoires d'eau contaminée. En effet, une large corrélation existe entre les résultats des contenus foliaires mesurés par radioactivité retrouvée dans les feuilles et les quantités calculées sur la base des quantités d'eau transpirée multipliées par la concentration en aclonifen dans l'eau du substrat (pour les feuilles de 6 plantules : 1^{ère} valeur calculée (en dpm) et 2^{ème} valeur mesurée (en dpm) T1 : 4100 et 3900, T2 : 8350 et 11280, T3 : 26235 et 25440, T4 : 26235 et 36600). Ces résultats ne préjugent pas d'une répartition homogène de l'herbicide au sein même de la feuille.

En fin d'expérience (T4 = 28 j), le bilan quantitatif d'aclonifen **dans UNE plantule** de blé est le suivant :

Racines :	46,4 pmoles accumulées (34 % de la quantité qui a pénétré)
Coléoptile :	9,6 pmoles accumulées (6,6 % de la quantité qui a pénétré)
Caryopse :	27,3 pmoles accumulées (19 % de la quantité qui a pénétré)
Feuilles :	61 pmoles accumulées (42 % de la quantité qui a pénétré)
(soit un total de 144,2 pmoles d'aclonifen par plantule)	

Chaque pot de culture a supporté 6 plantules durant 28 jours, l'accumulation est donc au total de 865 pmoles sur les 20 nmoles apportées dans l'eau de traitement. Le taux de capture par les végétaux dans l'expérimentation décrite est donc de 4,3% de la dose appliquée, dont près de la moitié (1,8%) atteint l'espace cible qui, dans le cas qui nous occupe, correspond à la feuille. La dose appliquée avait été choisie pour ne pas entraîner de symptômes.

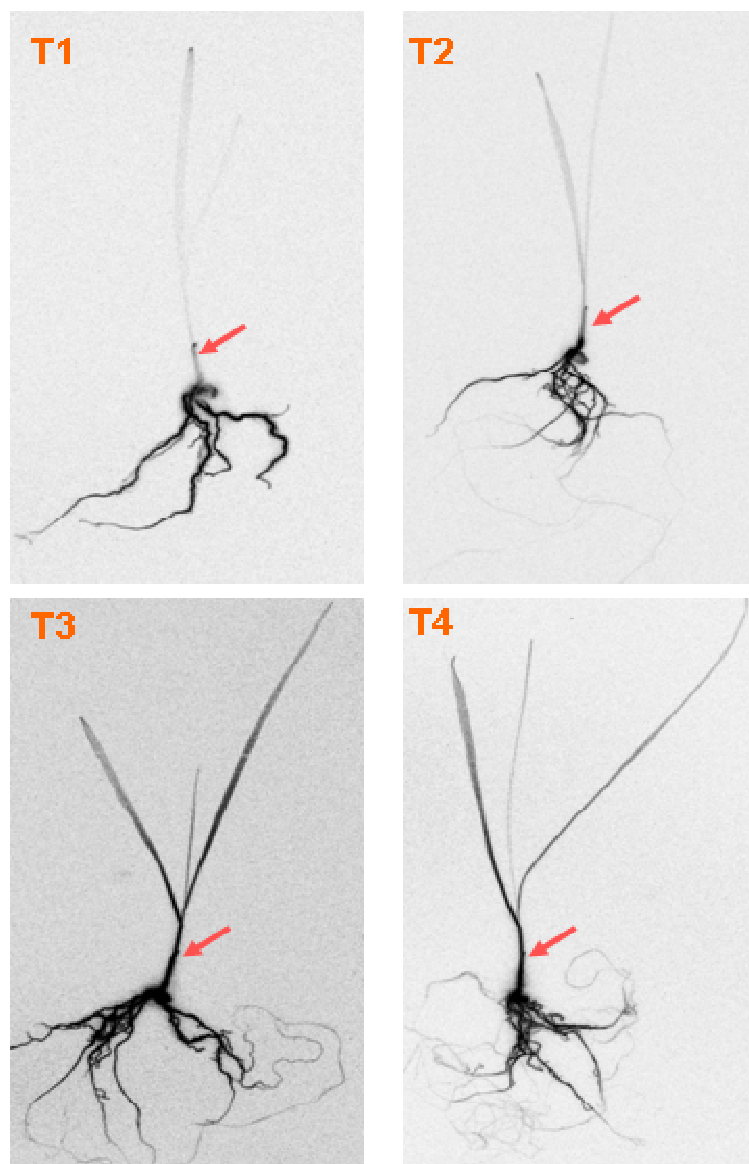


Figure III, 4 : Visualisation du marquage progressif de plantules de blé cultivées sur sable traité à l'aclonifen ¹⁴C (autoradiographie Phosphorimager Cyclone). T1, T2, T3 et T4 correspondent respectivement à 7, 14, 21 et 28 jours d'expérimentation. Les flèches rouges indiquent la position du coléoptile.

II) Pénétration de l'aclonifen dans des fragments de racines en survie.

Lors du traitement de prélevée, l'objectif est de transférer la matière active de la suspension concentrée commerciale vers l'espace interne racinaire, *via* l'eau associée au complexe argilo-humique. Cette matière active pourra dans la plupart des cas rejoindre le flux xylémien et atteindre des cibles biochimiques situées dans l'espace foliaire. C'est la situation classique d'emploi du Challenge 600 et de sa matière active. Le fait d'avoir un espace cible qui transpire entraîne à partir du sol, un flux d'eau chargée de matière active, ce qui modifie en permanence les équilibres internes entre concentration dans l'eau et concentration dans l'espace racinaire (Devine et al, 1987 ; Milhomme et Bastide, 1990). Afin d'éviter ce déséquilibre permanent à la lumière, nous avons cherché à comprendre comment et avec quelle rapidité l'aclonifen solubilisé dans l'eau pouvait rejoindre l'espace racinaire en supprimant le mouvement xylémien (suppression de la partie feuillée et mise en survie des

racines). Ainsi, nous avons mesuré la pénétration de l'aclonifen dans des racines excisées de maïs et de tournesol. Puis nous avons complété cette étude en comparant ces pénétrations par une étude sur coléoptiles isolés de maïs qui représentent un organe de la plus grande simplicité (gaine monocouche de parenchyme banal, non chlorophyllien et dépourvu de structures type cuticule protégeant contre les pertes d'eau).

A) Matériel et méthodes.

Les semences sèches de maïs et de tournesol décontaminées à l'eau de Javel (0,2 %) sont semées directement dans de grandes boîtes de Pétri dont le fond est recouvert d'un papier filtre humide. Les boîtes sont tenues fermées et à l'obscurité durant toute la croissance des plantules qui se déroule à 24°C. Au cinquième jour, les plantes sont disséquées au scalpel après un rinçage rapide à l'eau du système racinaire. La racine primaire mesure alors en moyenne 5 cm. Des fragments de racines de 2 cm contenant l'apex méristématique sont prélevés et directement installés individuellement dans des tubes Eppendorf de 2,5 ml de capacité maximale, contenant 1 ml d'eau contaminée par de l'aclonifen radioactif. La solution d'incubation contenant l'aclonifen correspond à de l'eau du robinet additionnée seulement de matière active marquée à la dose de 115.000 dpm/ml ce qui correspond à une solution vraie titrée à [1,43 μ M] (activité spécifique : 1 nmole = 80.000 dpm). L'extrémité sectionnée de la racine ne trempe pas dans cette solution. Le capuchon du tube est rapidement fermé pour éviter toute perte d'eau. Les temps d'incubation sont situés entre 30 min et 72 h. Pour chaque temps il y a 5 répétitions. A la fin du temps choisi, le fragment de racine est récupéré à l'aide d'une pince fine, puis rapidement rincé deux fois dans 5 ml d'eau. Cette récupération correspond à 2 ou 3 μ l de solution d'incubation adsorbée sur les fragments racinaires soit moins de 1% du volume initial de traitement. La radioactivité associée à cette partie adsorbée aux échantillons ne fait pas partie du pool d'aclonifen interne. Cette eau de rinçage sera comptée, le résultat du comptage sera considéré comme faisant partie de la solution d'incubation. L'échantillon rincé est mis dans un pot de comptage pour radioactivité, couvert par 1,5 ml d'un mélange de minéralisation de la matière organique (acide perchlorique, H₂O₂, H₂O : 1/1/1 : v/v/v) et en présence de 5 ml de KOH (0,1 M) comme piège à CO₂ (dont le CO₂ radioactif). La somme du comptage 'KOH' et 'solution de minéralisation' correspond à la somme d'aclonifen qui a pénétré pendant le temps d'incubation.

B) Résultats

1) Pénétration de l'aclonifen dans des racines excisées de plantules de maïs

Les résultats portant sur la pénétration de l'aclonifen dans des racines excisées de plantules de maïs sont présentés tableau III, 6. Au cours de l'expérimentation réalisée volontairement avec un faible compartiment donneur (1 ml de milieu d'incubation) afin de ne pas utiliser de trop fortes quantités de carbone marqué, nous avons constaté une variation importante de la teneur en aclonifen dans l'eau entre 115000 dpm à T 0 et 30000 dpm à T 72h. Cette variation est essentiellement liée à la pénétration dans les fragments de racines ou de à l'adsorption. Aussi avons-nous, à chaque temps de prélèvement mesuré le contenu radioactif non seulement dans les racines mais aussi dans l'eau d'incubation.

Tableau III, 6 : Résultats expérimentaux (5 répétitions) de partition et diffusion de l'aclonifen dans des fragments racinaires de maïs immergés pendant différents temps d'expérimentation (entre 30 min. et 72 h) dans l'eau d'incubation contenant la matière active solubilisée ([1,43 μ M] à T0). Les résultats des dosages sont exprimés en dpm/ml, en dpm/organe, en dpm/mg de masse fraîche, en concentration [μ M] dans la racine (nous avons estimé qu'un g de masse fraîche de racine correspondait à 1 ml). La dernière colonne du tableau correspond au rapport des concentrations mesurées dans les racines sur la concentration mesurée dans l'eau d'incubation au moment du prélèvement. Ce rapport correspond au facteur de partition effectivement mesuré. MF = masse fraîche.

Temps	Milieu Incubation (1ml) (dpm)	Quantité pénétrée dans racine (dpm)	Racine MF (mg)	(dpm) mg/MF racine	[racine] μ M	[eau] μ M	$\frac{[racine]}{[H_2O]}$
30 min	83330 ± 1680	7910 ± 340	16,3 $\pm 5,2$	485 $\pm 6,2$	6,5 ± 2	1,1 $\pm 0,1$	6,1 $\pm 1,5$
1 h	78100 ± 3550	11140 ± 950	13,4 $\pm 2,4$	843 ± 88	10,6 $\pm 1,1$	1 $\pm 0,1$	10,6 ± 1
2 h	73700 ± 3460	15950 ± 2590	15,3 ± 2	1040 ± 72	13 $\pm 0,9$	1 $\pm 0,1$	13,7 $\pm 1,4$
4 h	69700 ± 2090	20990 ± 2000	15,3 $\pm 2,1$	1390 ± 250	17,4 $\pm 3,1$	0,9 $\pm 0,1$	19,3 $\pm 3,6$
8 h	69650 ± 5500	22650 ± 3810	13,3 ± 3	1760 ± 360	22 $\pm 4,5$	0,8 $\pm 0,1$	29,3 $\pm 6,6$
17 h	57780 ± 1435	29460 ± 2410	13,1 $\pm 2,4$	2279 ± 310	28,5 $\pm 3,9$	0,8 $\pm 0,1$	38,3 $\pm 5,7$
48 h	44750 ± 4720	34670 ± 2170	14,9 $\pm 2,2$	2363 ± 280	29,6 $\pm 3,5$	0,6 $\pm 0,1$	52 $\pm 7,8$
72 h	29400 ± 4625	32100 ± 6640	13,5 $\pm 2,6$	2375 ± 235	29,7 $\pm 2,9$	0,4 $\pm 0,1$	80,8 $\pm 14,8$

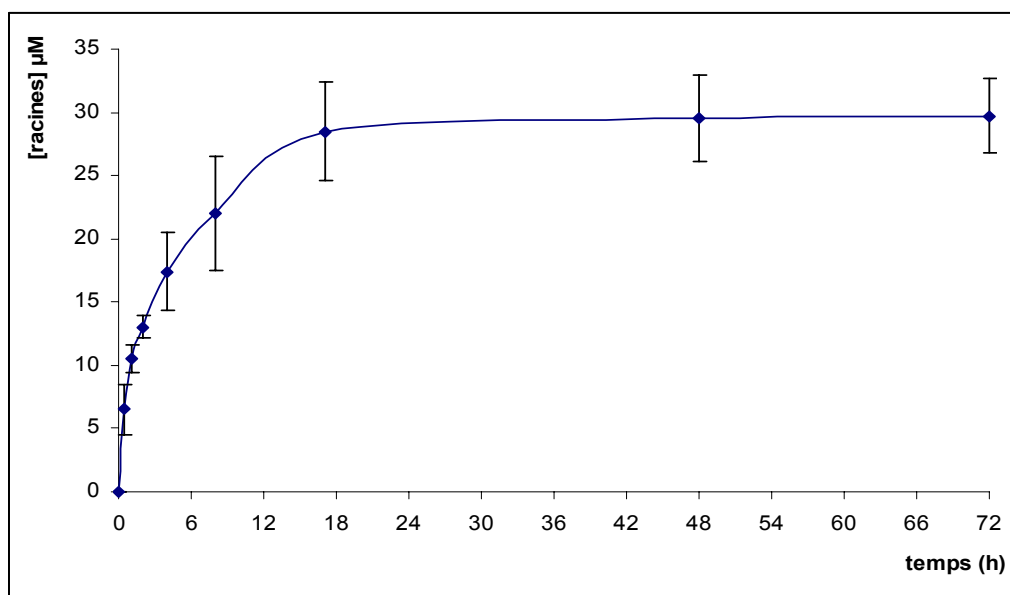


Figure III, 5 : Cinétique de pénétration de l'aclonifen dans des racines de maïs excisées et incubées dans une solution aqueuse contenant l'herbicide. Concentration initiale du milieu d'incubation [1,43 µM] soit 115.000 dpm par ml. Les temps d'incubation choisis sont de 30 min, 1, 2, 4, 8, 17, 48 et 72 h. Les valeurs indiquées sont les moyennes de 5 échantillons.

Par fragment racinaire la quantité d'aclonifen pénétré (en dpm par fragment) varie de 7900 dpm pénétré après 30 min. d'incubation et environ 30000 dpm atteint après 17h d'expérimentation. Aux deux derniers temps d'incubation choisis (48 et 72 h) la situation paraît à peu près stable. Ces résultats sont exprimés soit en dpm /mg de MF racinaire soit en [µM] dans l'espace racinaire. Avec cette dernière approche de la situation de pénétration, la situation de chargement des racines dans le temps à partir d'une solution aqueuse d'aclonifen est la suivante: à T 30 min. $6,54 \pm 2$ µM, à T 8h. $22 \pm 4,5$ µM (atteinte pratiquement d'un pallier), les situations à T 17h, 48 h et 72 h. étant pratiquement comparables (28,5/29,5/29,7). Cela tend à démontrer qu'un équilibre de partition/diffusion s'établit au cours du temps entre les différentes parties de la racine et le compartiment donneur contenant la matière active sous une forme totalement soluble dans l'eau (à faible concentration). Le rapport des concentrations racinaires sur les concentrations dans l'eau d'incubation à un temps donné correspond au facteur de partition de l'aclonifen entre un espace aqueux donneur et un espace cellulaire mixte (eau et membranes). Ce facteur de partition mesuré varie de $6,11 \pm 1,54$ pour le temps le plus court (30 minutes) à $80,8 \pm 14,8$ pour le temps long de 72 h. Cela traduit à notre sens la difficulté pour l'aclonifen de migrer dans les différents espaces cellulaires de nature chimique variée (phases hydrophiles et lipophiles mêlées). Ainsi, l'équilibre de partition de l'aclonifen apparaît comme long à s'établir. Dans le cas de la racine de maïs cet équilibre de partition pourrait être lent à s'établir

car le maïs semble tolérer, à basses doses, l'aclonifen. Si des phénomènes de métabolisation à l'origine de la tolérance ont lieu au niveau racinaire, les règles de partition s'en trouvent changées, le métabolite étant souvent plus polaire que la molécule mère.

Nous allons comparer ces valeurs mesurées, issues de l'expérimentation et des dosages de radioactivité avec les valeurs théoriques en prenant les coefficients de partition octanol/eau ($\log K_{ow} = 4,37$) mesuré par Rhône-Poulenc Agriculture Ltd Ongar (1992) mais aussi par nos soins ($\log P = 3,7$). Des études précédentes effectuées au laboratoire (thèse Muriel Raveton, 1997) ont montré que la teneur en lipides (et autres composés lipophiles extractibles par des solvants) de racines de plantules de maïs correspondait à 1,2% de la masse fraîche de la racine soit environ 12 $\mu\text{g/ml}$ de volume racinaire (988 μl étant représentés par des phases aqueuses cellulaires). Aussi, pour les calculs présentés tableaux III, 7-8, un gramme de racine fraîche correspond à 988 μl d'eau en équilibre avec la concentration de l'eau du milieu d'incubation et 12 μl de composée assimilables à des lipides chargés d'aclonifen à hauteur du facteur de partition ($P = 25000$ pour un $\log K_{ow}$ de 4,37 et $P = 5000$ pour un $\log P$ de 3,7).

Procédure de calcul avec pour exemple la teneur en aclonifen dans l'eau d'incubation à $T = 72$ h. Ces calculs correspondent à un état d'équilibre partition/diffusion quelque soit le temps d'expérimentation.

Valeur calculée sur 1 g de masse fraîche pour $T = 72$ h.

Valeur dans l'eau d'incubation 29400 dpm.

Radioactivité calculée dans l'eau cellulaire d'un g de MF : $\frac{29400 \times 988}{1000} = 29050$

*Radioactivité calculée dans les lipides (12 μl) : $\frac{29400 \times 12 \times 5000}{1000} = 1764000$
(pour $\log P$ de 3,7)*

Soit $29050 + 1764000$ théorique/g de masse fraîche (1793 dpm/mg de masse fraîche)

Avec la deuxième valeur de $\log P$ (4,37), le calcul fait de la même manière donne $29050 + 8700000$ dpm/g de masse fraîche soit 8729 dpm/mg de masse fraîche.

Tableau III, 7 : Valeurs théoriques de la concentration interne racinaire (maïs) suite à un temps d'incubation variable dans une eau additionnée d'aclonifen complètement solubilisé. On considère que pour 1g de masse fraîche de racine 988 mg (ou μ l) se comportent comme de l'eau et 12 mg de lipides avec pour l'aclonifen un $\log P = 3,7$ soit $P = 5000$.

Temps (h)	Q_A Radioactivité dans l'eau cellulaire (dpm)	Radioactivité dans 12 mg de lipides ($\log P = 3,7$)	Q_B Radioactivité totale (dpm)/g de racine	Total dpm/mg MF racine	Q'_B Total mesuré (dpm)/g MF racine	Partition calculée [Q_B dans 1g] [Q_A dans 1 ml]
30'	83330 \pm 1680	4998000	5080360	5080	485 000	61
1 h	78100 \pm 3550	4685220	4762370	4762	843 000	61
2h	73700 \pm 3460	4419360	4492132	4492	1040 000	61
4h	69700 \pm 2090	4183020	4251900	4252	1390 000	61
8h	69650 \pm 5500	3578820	3637751	3637	1760 000	61,7
17 h	57780 \pm 1435	3466440	3523520	3523	2279 000	59
48 h	44750 \pm 4720	2685120	2729335	2729	2373 000	61
72h	29400 \pm 4625	1764060	1793108	1793	2375 000	61

Tableau III. 7, montre qu'en début d'expérience, l'équilibre de partition entre phase lipophile et eau dans la racine n'est pas atteint : le coefficient de partage théorique racine/eau est proche de 61. Le coefficient de partage mesuré à ce stade est proche de 5,8. Au cours de l'expérience, le coefficient de partage racine/eau augmente progressivement jusqu'à la valeur théorique de 61, obtenue après 48h.

A 72h ce coefficient passe à la valeur du 80,8 (Tableau III. 8), supérieur à la valeur théorique. Cette élévation peut s'interpréter soit du fait d'une valeur trop faible pour le $\log P$, soit du fait d'une métabolisation suivie de la ségrégation des métabolites formés. Une 3^e cause pourrait résulter d'une estimation insuffisante de la teneur en composées lipophiles.

En prenant pour $\log P$ de l'aclonifen une valeur supérieure correspondant à une mesure publiée dans le dossier d'homologation (4,37), le coefficient de partage racine/eau calculé comme précédemment donne alors des valeurs de l'ordre de 300, c'est-à-dire 5 fois plus fortes que pour un $\log P$ de 3,7.

Les valeurs de partition réellement mesurées plaident en faveur d'un $\log P$ inférieur à 4.

Tableau III, 8 : Valeurs théoriques de la concentration interne racinaire (maïs) suite à un temps d'incubation variable dans une eau additionnée d'aclonifen complètement solubilisé. On considère que pour 1g de masse fraîche de racine 988 mg (ou ml) se comportent comme de l'eau et 12 mg. Avec pour l'aclonifen un $\log P = 4,37$ soit $P = 25000$.

Temps (h)	Q_A Radioactivité dans l'eau 1 g cellulaire (dpm)	Radioactivité dans 12 mg de lipides ($\log P = 4,37$)	Q_B Radio activité totale (dpm)/g de racine	Total dpm / mg MF racine	Q'_B Total mesuré (dpm)/g MF racine	Partition calculée [Q_B dans 1g] [Q_A dans 1 ml]
30'	83330 ± 1680	24690000	24772300	24772	485 000	297
1 h	78100 ± 3550	23426100	23503250	23503	843 000	301
2h	73700 ± 3460	22096800	22169572	22169	1040 000	301
4h	69700 ± 2090	20915100	209833980	20984	1390 000	301
8h	69650 ± 5500	17894100	17953031	17953	1760 000	301
17 h	57780 ± 1435	17332200	17332200	17332	2279 000	300
48 h	44750 ± 4720	13425600	13469815	13469	2373000	301
72h	29400 ± 4625	8820300	8849348	8849	2375000	301

Une dernière remarque globale concerne le comportement de l'aclonifen vis-à-vis du système racinaire : l'état d'équilibre de partition (dans des conditions favorables d'acquisition) n'est obtenu qu'après deux jours d'exposition minimum. Ainsi, la mobilité de l'aclonifen dans les tissus végétaux apparaît lente. Les conditions d'acquisition par des racines au champ, lors de traitements de prélevée ne sont certainement pas si favorables que celles mises en œuvre dans nos expérimentations.

2) Pénétration de l'aclonifen dans des racines excisées de tournesol

Avec un mode opératoire semblable à celui utilisé ci-dessus pour les racines de maïs nous avons cherché, chez le tournesol, à mesurer les facteurs de partition dans l'organe racinaire clé pour des traitements de prélevée, et à comparer la situation du maïs et tournesol. Les résultats obtenus par mesure de radioactivité sont présentés dans le tableau III, 9.

Le tableau III 9 montre que le coefficient du partage racine/eau dans la plantule de tournesol est très comparable à celui du maïs. Cependant, la remontée de ce coefficient est beaucoup plus rapide que pour le maïs : la valeur de Q'_B/Q_A supérieure à 60 est observée dès 24h alors que cela nécessite 72h pour le maïs (à supposer que la teneur en lipides de racines de tournesol soit aussi de 12/1000). Cette observation suggérerait que la métabolisation puisse jouer un rôle net chez cette plante. Une autre hypothèse cependant, émergera, dans le dernier chapitre de ce mémoire avec les remarquables capacités d'absorption de l'axe hypocotylé. Plus le pouvoir métabolique de transformation sera fort plus les règles de partition/diffusion de l'ensemble métabolites + matière active seront changées par rapport à la partition mettant

en jeu uniquement la seule matière active. Il existe une réelle nécessité de comprendre le fonctionnement de la racine de tournesol vis-à-vis de l'aclonifen toléré par cette culture.

Tableau III, 9 : Cinétique de pénétration de l'aclonifen dans des racines de tournesol excisées et immergées durant un temps variable (de 1h à 24h) dans une solution aqueuse d'herbicide [1,43 μ M] à T 0 (115000 dpm). Le tableau indique : les teneurs en aclonifen (dpm) dans le ml d'eau d'incubation, les quantités (dpm) pénétrées par racine, les quantités (dpm) pénétrées par mg de masse fraîche de racine, les concentrations (μ M) dans l'eau et dans les racines, et enfin, le rapport [racine]/[eau d'incubation] qui illustre la partition mesurée entre l'eau externe et l'espace racinaire interne.

Temps (h)	Q _A Milieu incubation (1 ml) (dpm)	Quantité pénétrée dans racine (dpm)	Masse fraîche racine (mg)	Q' _B par g MF racine (dpm)	Partition calculée [Q' _B dans 1g] [Q _A dans 1 ml]
1 h	91650 \pm 4570	9170 \pm 1600	16,8 \pm 2,2	548 000 \pm 6100	6 \pm 0,9
2 h	76900 \pm 7500	16380 \pm 2740	22,8 \pm 4,8	740 000 \pm 13900	9,6 \pm 1,4
4 h	64860 \pm 5710	22540 \pm 1340	19,1 \pm 3,04	1 208 000 \pm 3500	18,6 \pm 4,9
12 h	55200 \pm 6450	31020 \pm 5500	14,7 \pm 2,96	2 200 000 \pm 65000	39,9 \pm 16,8
24 h	45550 \pm 8050	28470 \pm 5360	7,4 \pm 2,2	4 086 000 \pm 115700	89,7 \pm 25,3

3) Pénétration de l'aclonifen dans des coléoptiles de maïs.

Pour compléter ces études de pénétration de l'aclonifen dans des organes de plantules nous avons souhaité utiliser un matériel simple (parenchyme primaire sans couverture de protection contre les pertes d'eau de type cuticule) : le coléoptile. Il s'agit d'un petit fourreau formé d'une unique couche cellulaire, creux, qui apparaît très tôt lors de la mise en place de la plantule des graminées. Sa masse ne dépasse pas les 50 mg de masse fraîche chez le maïs pour 3 cm de longueur en moyenne. De tels coléoptiles sont récoltés sur de jeunes plantules, sectionnés pour donner des cylindres de 1 cm de longueur et fendus dans le sens de la longueur pour permettre une immersion dans la solution aqueuse d'incubation avec l'aclonifen. Sans fente dans le sens de la longueur l'échantillon flotte en surface de la solution de traitement. Ce modèle mime selon nous le modèle cellulaire le plus simple structurellement qu'on puisse expérimenter. Les résultats de partition en fonction du temps sont présentés tableau III, 10 (milieu d'incubation : eau avec [1,43 μ M] d'aclonifen radioactif : 115000 dpm/ml).

Tableau III, 10 : Cinétique de pénétration de l'aclonifen dans des coléoptiles de maïs excisés et fendus, puis immergés durant un temps compris entre 1h et 48h dans une solution vraie d'aclonifen marqué au ^{14}C (115000 dpm/ml). Le tableau indique les teneurs en aclonifen (dpm) dans le ml d'incubation, les quantités (dpm) pénétrées par fragment, les quantités (dpm) pénétrées par mg de masse fraîche de coléoptile, les concentrations (μM) dans l'eau et dans le coléoptile, enfin, le rapport de la concentration racinaire/la concentration du milieu d'incubation, rapport qui se veut être une illustration de la partition mesurée par dosage en scintillation liquide.

Temps (h)	Milieu incubation (dpm)	Quantité pénétrée dans coléoptile (dpm)	MF coléoptile (mg)	dpm/mg MF coléoptile	[coléop] μM	[eau] μM	$\frac{[\text{coléoptile}]}{[\text{H}_2\text{O}]}$
1 h	72700 ± 7930	20800 ± 4007	49,4 $\pm 8,6$	421,6 ± 48	5,3 $\pm 0,6$	0,91 $\pm 0,1$	5,9 $\pm 1,1$
4h	51630 ± 3630	34570 ± 5420	45,4 $\pm 7,3$	766,2 ± 100	9,6 $\pm 1,3$	0,65 $\pm 0,05$	14,8 $\pm 1,6$
8h	49360 ± 10200	36850 ± 2500	48,3 $\pm 8,9$	788 ± 189	9,9 $\pm 2,4$	0,62 $\pm 0,13$	15,9 $\pm 3,1$
24 h	43250 ± 4420	43710 ± 4040	45,5 $\pm 8,2$	974 ± 102	12,2 $\pm 1,3$	0,54 $\pm 0,06$	22,3 $\pm 4,1$
48 h	41430 ± 2525	38370 ± 4720	38,1 $\pm 7,5$	1027 ± 130	12,8 $\pm 1,6$	0,52 $\pm 0,03$	25,2 $\pm 2,6$

L'expérimentation avec les coléoptiles de maïs est la plus favorable à la pénétration rapide de l'aclonifen parmi les trois expérimentations qui viennent d'être décrites. En effet, le coléoptile préparé comme indiqué présente deux faces de pénétration (c'est un tube avec une seule couche cellulaire) alors que les racines sont des cylindres formés de plusieurs couches cellulaires, organisés en tissus variés en rôle et en composition. De plus, pour les coléoptiles les deux sections en coupes transversales et la section longitudinale du tube, sont des voies artificielles qui paraissent préférentiellement ouvertes à la pénétration de la matière active. Les résultats semblent indiquer que la pénétration est maximale dès 24h (facteur de partition de 22,3), déjà largement atteinte à 8 h (partition de 15,9). Le maximum de partition obtenu dans le cas des coléoptiles est de l'ordre de 25,2 à 48h alors qu'il est de plus de 50 dans les racines de la même plante au même temps, ce qui tend à indiquer que les réserves cellulaires en lipides des tissus du coléoptile sont faibles comparées à celles des racines. Il n'en demeure pas moins que, malgré les facilités anatomiques de pénétration de l'aclonifen dans l'espace du coléoptile, la migration de l'aclonifen jusqu'à un état d'équilibre de partition ne se fait pas instantanément, ce qui nous conforte dans l'idée que la migration de l'aclonifen dans l'espace symplasmique et apoplastique d'un végétal ne se fait pas de manière simple et rapide.

III) Pénétration transcuticulaire de l'acétonifène dans des fragments foliaires en survie.

Les résultats obtenus sur colza en traitement de prélevée à la dose agronomique de 2,7 kg/ha nous ont démontré (chapitre I) qu'il n'existait pas de marge de sélectivité pour cette culture vis-à-vis de l'acétonifène utilisé en traitement de sol. L'objectif de cette partie est de voir, avec la formulation Challenge 600 adaptée à la prélevée mais volontairement appliquée en postlevée, si la pénétration par la voie cuticulaire sur cette crucifère largement pourvue en cires et cutine est, suffisamment problématique pour conduire à des concentrations internes non phytotoxiques. Ainsi, nous avons choisi de mesurer, sur des fragments foliaires en survie au laboratoire, les taux de pénétration foliaire de l'acétonifène formulé de différentes façons afin d'envisager un éventuel traitement en culture intensive de colza en post-levée précoce voire tardive. Pour s'assurer du succès agronomique dans le cas d'un changement de pratique culturale, il convient de vérifier qu'avec la formulation de prélevée homologuée (Challenge 600), la quantité entrant dans les feuilles de colza n'atteint pas une concentration interne toxique pour la culture. En parallèle, nous suivons la pénétration de l'acétonifène dans des fragments foliaires d'un des adventices fréquents de cette culture : le vulpin. Enfin, une étude portant sur la pénétration foliaire chez le tournesol sera présentée. Elle a pour intérêt de mieux comprendre la pratique d'utilisation de l'acétonifène en postlevée sur cette culture.

A) Matériels et méthodes

1) Préparation de cristaux d'acétonifène marqués au ^{14}C pour le traitement de disques foliaires :

Afin de suivre facilement par comptage en scintillation liquide la pénétration foliaire de l'herbicide, nous avons opté pour l'emploi d'acétonifène froid additionné de la molécule radioactive servant de traceur. Pour avoir des suspensions de traitement homogènes en acétonifène radioactif et non radioactif nous avons été obligé de mettre en œuvre le protocole présenté figure III, 6.

Nous avons obtenu 14 g. de cristaux purs à partir de 25 ml de Challenge 600 suivant le protocole vu au chapitre I. Ceux-ci sont solubilisés dans de l'acétone et additionnés d'acétonifène radioactif solubilisé dans de l'éthanol (activité spécifique de la solution mère radiomarkée : 80 000 dpm/nmole). La solution acétonique radioactive obtenue est alors maintenue 10 jours en chambre froide sous agitation modérée, pour s'assurer d'un bon équilibre entre les molécules marquées et les molécules froides, puis concentrée jusqu'à précipitation des cristaux.

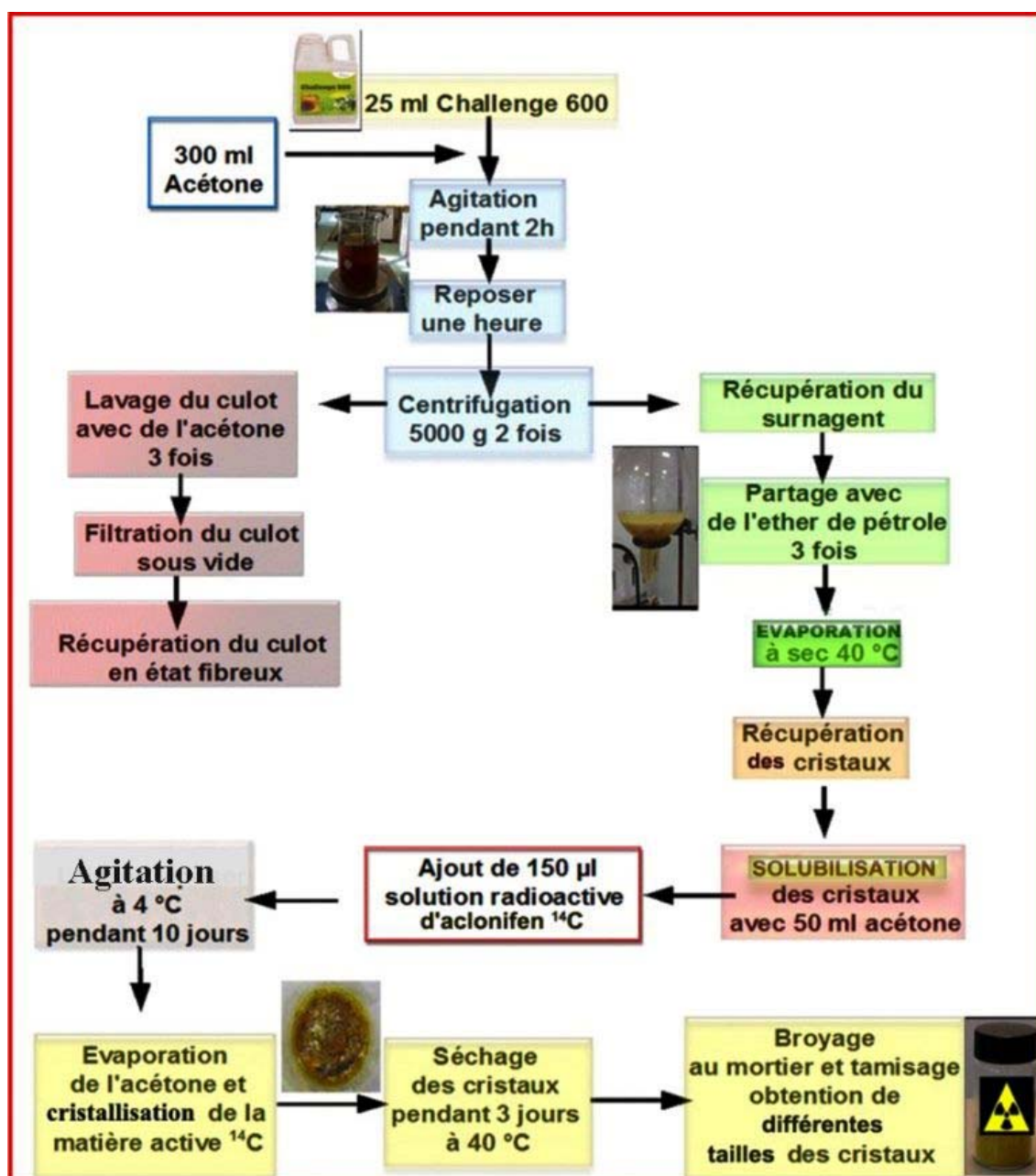


Figure III, 6 : Grandes étapes d'extraction, de purification et de marquage des cristaux d'aclonifen à partir de la forme commerciale Challenge 600 et de la matière active ^{14}C .

Avec les précautions d'usage, les cristaux radioactifs sont alors broyés dans un mortier et tamisés nous permettant d'avoir, grâce à des toiles à bluter, trois calibres de cristaux : $< 250 \mu\text{m}$, $250 \text{ à } 500 \mu\text{m}$ et $> 500 \mu\text{m}$. La teneur en aclonifen radioactif est alors mesurée : 10 mg de cristaux sont solubilisés dans 2 ml d'éthanol et comptés par scintillation liquide. L'activité spécifique de la préparation est de 4 dpm/nmole ($14 \text{ g du mélange} = 2,24 \cdot 10^9 \text{ dpm}$). Ce sont les cristaux les plus fins qui sont retenus pour la suite de l'expérimentation.

2) Préparation des disques de feuille de colza et des fragments foliaires de vulpin :

Les plants de colza utilisés durant cette expérimentation sont issus d'un semis de septembre 2007 en serre sur un lit de sol (5m/2m) de 30 cm de profondeur. Le sol est constitué à parts égales de terre franche, de terreau et de sable. Les exemplaires de colza utilisés en janvier 2008 sont au stade 5-6 feuilles (semblables à celui présenté figure III, 6). Les feuilles utilisées sont des feuilles adultes en position 3 ou 4 à partir du collet (feuilles de 20 cm de long, 12 cm de large).

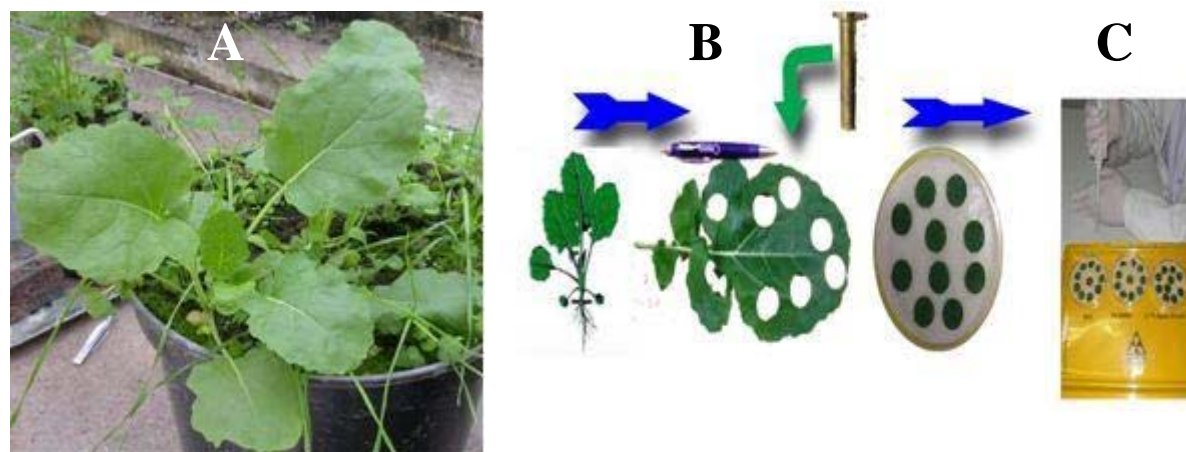


Figure III, 7 : Aspect des plants de colza (4 mois de culture) au moment de la mise en expérimentation. A – plant de colza au stade 5-6 feuilles, B – emporte-pièce, feuille prélevée et échantillonnée, dépôt des disques foliaires sur boîte de Pétri humide, et C, dépôts des solutions d'aclonifen sur la face supérieure des disques foliaires.

Les feuilles fraîchement détachées de la plante sont mises dans un grand cristallisateur, pétioles plongeant dans un récipient plein d'eau. Les disques foliaires sont rapidement prélevés, puis découpés à l'aide d'un emporte-pièce (figure III, 7), les disques de 2,5 cm de diamètre et de 3,9 cm² (0.04 dm²) de surface. La masse fraîche d'un disque est de $141,7 \pm 7,39$ mg et la masse sèche de $12,8 \pm 0,8$ mg (moyenne sur 30 échantillons). Les disques sont extraits rapidement de l'outil, la blessure est rincée à l'eau du robinet et le disque foliaire est stocké dans une boîte de Pétri sur un papier filtre humide. Sur chaque feuille de colza, sont prélevés (en dehors des grosses nervures) 10 disques numérotés dans l'ordre de 1 à 10, 5 disques de chaque côté de la nervure principale N° 1 et 6 vers le pétiole, N° 5 et 10 en extrémité de feuille. Afin d'avoir des lots de disques foliaires représentatifs de l'ensemble des feuilles prélevées, l'échantillonnage sur 10 feuilles est utilisé, les lots étant constitués ainsi : disque N°1 de la feuille 1, disque N°2 de la feuille 2, disque N°3 de la feuille 3.....disque N° 10 de la feuille 10 et ainsi de suite. Ainsi, chaque expérience est concernée par 10 disques foliaires prélevés dans des situations homogènes sur 10 feuilles physiologiquement actives représentatives de l'état global de la culture.

Pour une expérimentation donnée, les 10 disques sont installés dans une boîte de Pétri de 14 cm de diamètre, le fond de la boîte est recouvert d'une double couche de papier filtre humecté avec 10 ml d'eau. Une fois les disques installés de manière homogène sur le papier, le traitement est réalisé par dépôt de 100 μ l par disque de la solution ou des suspensions de traitement (10 à 15 gouttes pour le volume total de 100 μ l par disque).

En ce qui concerne le vulpin, les plantes sont cultivées en plein air sur le terrain proche du laboratoire. Le semis a lieu en septembre 2007 et les prélèvements de feuilles sont effectués en février 2008. Les plants se présentent sous forme de touffes denses. Des feuilles saines situées en position 3 ou 4 sur les talles sont prélevées. La longueur des feuilles est d'une 40^{aine} de cm et la largeur médiane est de l'ordre du 1 cm. Les bases sectionnées sont rapidement plongées dans un récipient contenant de l'eau et l'ensemble est ramené au laboratoire.

Chaque feuille ne donne qu'un seul fragment, celui-ci est choisi au centre de la feuille. A l'aide d'un scalpel un fragment de 8 cm de long (et 1 cm de large) est préparé. Les fragments (masse fraîche = $61,7 \pm 15,7$; masse sèche = $12,8 \pm 4,1$; surface = $8 \pm 0,3$ cm²) ainsi obtenus sont rincés sur les sections de coupe et stockés avant mise en expérimentation dans des boîtes de Pétri saturées en eau.

Les fragments de vulpin vont subir les mêmes conditions expérimentales que celles appliquées aux disques foliaires de colza (100 μ l de solution ou suspension d'aclonifen répartis en 10-15 gouttes). Afin de maintenir les fragments de vulpin à peu près plats dans la boîte de Pétri nous avons appliqué aux extrémités des fragments une fine couche de papier filtre humidifié (figure III, 8). Le positionnement des gouttes de solution aqueuse ou de suspension avec 1% de DMSO est bien plus délicat sur vulpin que sur colza (à cause de la rigidité de la nervure centrale). Dans le cas de la solution aqueuse vraie et dans celui de la suspension aqueuse en présence de 1% de DMSO certaines gouttes ont parfois glissé et imprégné le papier filtre hydratant les fragments foliaires. La situation expérimentale de dépôt est plus facile avec les préparations contenant des adjuvants de formulation provenant du Challenge 600.

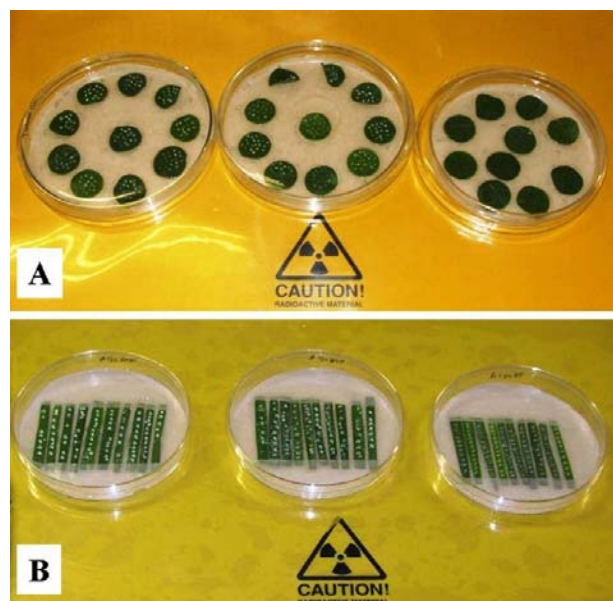


Figure III, 8 : Photographies illustrant la mise en suivie de fragments foliaires de colza âgé de 4 mois (A) et de vulpin âgé de 5 mois, (B) dans des boîtes de Pétri fermées contenant un papier filtre humide. Les traces claires sur les échantillons foliaires correspondent aux dépôts de gouttes contenant le traitement herbicide. Le dispositif fermé est maintenu en chambre de culture jusqu'au prélèvement pour dosage.

3) Traitement des disques foliaires :

L'aclonifen est apporté à trois concentrations différentes dans nos essais : une dose faiblement concentrée (265 ng/ml) uniquement constituée que d'aclonifen radioactif (1^{ère} dose). C'est une solution aqueuse vraie sans effet physiologique attendu. Les deux autres traitements sont préparés avec les cristaux d'aclonifen contenant une part faible de radioactivité. Le deuxième traitement est appliqué à une dose représentant la demi-dose homologuée à l'hectare (4,5 mg /ml). Enfin, la troisième dose mise en œuvre représente la dose agronomique (9 mg/ml).

Pour chaque dose de traitement trois formulations ont été mises en œuvre : une solution aqueuse, une solution aqueuse préparée avec 1% de DMSO et une dernière formulation contenant de l'eau additionnée de 1,5 % d'agents de formulation extraits du Challenge 600. Excepté pour la dose inférieure constituée uniquement d'aclonifen radioactif à une concentration inférieure à la limite de solubilité dans l'eau, les autres préparations sont des suspensions de cristaux (observations microscopiques figure 3.20). Dans ces deux derniers cas, afin d'obtenir des dépôts foliaires aussi homogènes que possible, les suspensions sont maintenues sous agitation forte lors du dépôt. Durant cette phase d'agitation 100 µl de suspension sont prélevés à l'aide d'une pipette automatique et déposés rapidement sur le fragment foliaire à traiter. Ainsi, les masses d'aclonifen déposées par fragment foliaire sont respectivement de 26,5 ng dans le 1^{er} traitement, de 0,45 mg pour le 2^{ème} et de 0,9 mg dans le 3^{ème} traitement correspondant à la dose agronomique.

4) Résumé des différentes conditions de traitements :

Trois concentrations en aclonifen sont expérimentées : dose avec radioactivité seule (10 ml d'eau et 10 µl de la solution mère radioactive diluée 10 fois = 265 ng d'aclonifen/ml), demi-dose agronomique (4,5 mg/ml), et dose agronomique (9 mg/ml). Trois formulations : eau seule, eau plus 1% DMSO et eau plus 1,5 % de produits de la formulation Challenge. Cela représente 9 conditions expérimentales différentes.

La pénétration foliaire et la mesure des contenus foliaires ont été mesurées à cinq temps différents : T0, T 30min, T 2h, T 17h et enfin T 48h. Nous avons donc étudié la pénétration foliaire de l'aclonifen dans le colza et dans le vulpin dans 45 situations expérimentales différentes (5 temps x 3 concentrations x 3 formulations).

Les fragments foliaires ainsi traités sont installés en salle conditionnée (24 °C, 16 h de lumière/24h, HR 100% car les boîtes de Pétri restent fermées). La manipulation des boîtes contenant les fragments traités est à réaliser avec la plus grande prudence afin que les gouttes de dépôt ne quittent pas les fragments foliaires (surtout avec les solutions aqueuses et celles formulées uniquement avec le DMSO).

5) Récupération et dosage de l'aclonifen en fin d'expérimentation :

Lorsque le temps d'expérimentation est écoulé, les fragments foliaires sont délicatement récupérés un à un à la pince. Préalablement les gouttes de traitement encore présentes sont récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur et mises dans un pot de comptage pour scintillation. Les fragments ainsi préparés sont alors rapidement rincés dans de l'eau (10 ml) dont le contenu en radioactivité sera compté. Suit un deuxième rinçage à l'eau (10 ml) puis un troisième rinçage à l'éthanol (10 ml). Dans les cas où le traitement est effectué avec une suspension, l'ordre des lavages est inversé : 1^{er} et 2^{ème} avec 10 ml d'éthanol (pour solubiliser les cristaux) et 3^{ème} avec de l'eau (10 ml). Pour une condition expérimentale donnée la somme de ce qui est récupéré à la pipette associé à ce qui est récupéré dans les rinçages correspond à la part du dépôt qui n'a pénétré ni dans la cuticule, ni plus profondément dans la feuille.

Ce qui a pénétré dans les fragments foliaires est mesuré, fragment par fragment, par scintillation liquide après minéralisation des fragments (mélange de digestion : acide perchlorique, H₂O₂, H₂O, 1/1/1 ; v/v/v). Le CO₂ radioactif généré par la digestion chimique est piégé par une solution KOH 1 M. La solution de digestion et la solution de potasse sont soumises à un comptage, la somme des deux comptages donne la quantité ayant pénétré dans le fragment foliaire considéré.

6) Comptabilisation de la quantité d'aclonifen contenue dans le compartiment cuticulaire des disques foliaires de colza :

Afin de discriminer la part de l'herbicide ayant pénétré dans la partie apoplastique cuticulaire sans atteindre d'autres compartiments, de celle ayant pénétré dans d'autres compartiments nous avons procédé de la manière suivante. Des disques foliaires (4) sont mis en expérimentation après avoir déposé sur chacun d'eux 100 µl de solution contenant 265 ng/ml d'aclonifen radioactif (10.000 dpm/disque) et 1,5% d'agents de formulation (conditions les plus favorables à la pénétration). Après 2h d'expérimentation, les disques sont lavés 2 fois par 10 ml d'eau et 1 fois par 10 ml d'éthanol. La somme de ce qui est retrouvé dans ces 3 fractions correspond à ce qui n'a pas pénétré. Les disques ainsi rincés sont alors lavés rapidement par 5 fois 0,5 ml de chloroforme. Ce solvant solubilise les cires épi- et intra-cuticulaires entraînant du même coup l'aclonifen contenu dans cet espace lipophile cuticulaire. Le comptage de la solution chloroformique se fait par scintillation liquide avec un mélange scintillant adapté aux solvants lipophiles. L'opération de lavage au CHCl₃ doit être suffisamment rapide pour ne pas extraire les composés lipophiles plus internes contenus dans les cellules de l'épiderme supérieur ou du parenchyme chlorophyllien (pigments par exemple). Les taux de pénétration à T0 ne sont pas complètement nuls car la manipulation des échantillons entre le dépôt et le 1^{er} rinçage prend un peu de temps. C'est plutôt un temps T 5 min qu'il convient de considérer.

B) Résultats

1) Evolution du taux de pénétration de l'aclonifen dans les disques foliaires de colza :

Avec l'eau comme seul solvant, les taux de pénétration atteignent 80,6% à 48h avec la concentration la moins forte en aclonifen. Les gouttes de dépôt ne séchant pas (HR 100%) nous avons une situation de biodisponibilité de l'aclonifen maximale (solution vraie). Durant les deux premières heures le flux de pénétration est intense (35% par heure), durant les 15 heures qui suivent le flux diminue beaucoup (0,95% par heure) et diminue encore entre 17 et 48 h (0,3% par heure). Au rythme de la dernière période analysée (entre 17 et 48h) le 100% de pénétration devrait être atteint après 70 h soit environ 6 jours après le dépôt de la matière active.

A basse concentration (265 ng/ml), la présence de DMSO (1%) ou d'agents de formulation ne change pas de manière significative la situation de pénétration mesurée avec l'eau seule. Le fait de partir d'une solution vraie dans un système où les gouttes de dépôt ne sèchent pas semble la situation la plus favorable à la pénétration de l'herbicide.

Tableau III, 11 : Pourcentage de pénétration de l'aclonifen dans des disques foliaires de colza maintenus en survie. Cinq temps d'expérimentation (T0 à T48h), trois concentrations en aclonifen : A = 265 ng/ml (solution vraie), B = 4,5 mg/ml (demi-dose agronomique) et C = 9 mg/ml (dose agronomique), trois formulations : H₂O seule, H₂O + 1% DMSO, et H₂O + 1,5% agents de formulation Challenge (AF).

Temps	A+H ₂ O	A+1% DMSO	A+1,5% AF	B+H ₂ O	B+1% DMSO	B+1,5% AF	C+H ₂ O	C+1% DMSO	C+1,5% AF
T ₀	13,6 ± 4,8	11 ± 3,1	8,9 ± 2,8	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,5	1,4 ± 0,7	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,9 ± 0,4
T _{30'}	15,1 ± 6,7	18,3 ± 6,2	23,4 ± 4,9	0,8 ± 0,5	1,1 ± 0,6	1,5 ± 0,8	0,6 ± 0,5	0,7 ± 0,3	1,8 ± 0,6
T _{2h}	57,4 ± 6,1	61,2 ± 6,4	69,2 ± 4,9	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,7	2,4 ± 1,4	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,3	2,7 ± 1,2
T _{17h}	75,6 ± 5,9	75,3 ± 4,6	83,5 ± 3,9	2 ± 0,5	2,4 ± 1,1	4,2 ± 0,9	1,7 ± 0,6	2,1 ± 0,5	3,6 ± 1
T _{48h}	80,6 ± 8,2	83,1 ± 5,4	93,8 ± 6,1	2,6 ± 0,5	2,6 ± 0,5	4,8 ± 1,2	2 ± 0,5	2,2 ± 0,5	3,6 ± 1
<i>Quantité (ng) pénétrée par cm²</i>									
Temps 48h	5,4 ± 1,7	5,4 ± 1,15	3,4 ± 1,47	3000 ± 300	3000 ± 300	5538,5 ± 1500	4615,4 ± 300	5076,9 ± 300	8307,7 ± 900

A la demi-dose agronomique (4,5 mg/ml), une part importante de l'aclonifen n'est pas solubilisée (observation de la suspension sous microscope). La situation de formulation eau + 1% de DMSO n'assure pas une pénétration plus importante que l'eau seule. Seul l'ajout d'agents de formulation Challenge favorise l'entrée de l'aclonifen dans les disques foliaires (environ 85% de plus à 48 h comparé à la formulation « eau seule »). Il faut cependant remarquer que si l'on ne considérait que l'aclonifen solubilisé dans l'eau au moment du dépôt (1,4 mg/l soit 0,14 µg/100 µl déposés) cela donnerait une pénétration maximale de 0,003% alors que dans les faits nous trouvons 1000 fois plus. Cela signifie qu'au fur et à mesure que l'aclonifen solubilisé dans l'eau pénètre par partition dans la cuticule des disques, un nouvel équilibre se rétablit entre les cristaux d'aclonifen et l'eau des gouttes assurant ainsi une mise en solution et assurant une teneur constante dans l'eau de la goutte au cours de l'expérimentation.

La situation physiologique de pénétration aux doses agronomiques est sensiblement la même que celle obtenue avec la demi-dose. L'effet DMSO n'est pas clairement évident alors que les agents de formulation permettent à chaque instant une pénétration accrue de matière active (80% d'augmentation à T48h comparé à la formulation « eau seule »). Les figures III, 9 résument les résultats de pénétration obtenus.

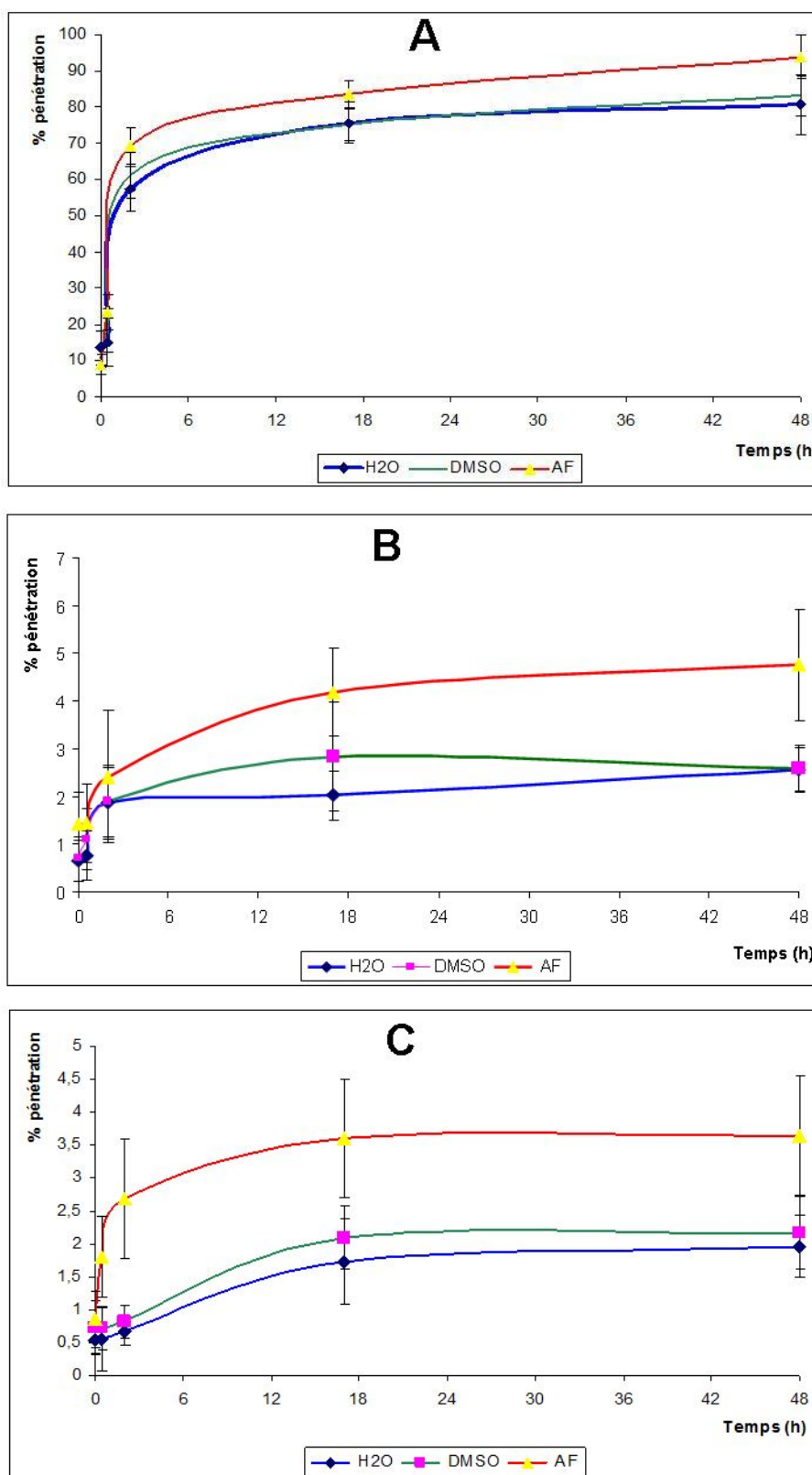


Figure III, 9 : Pourcentage de pénétration en fonction du temps de l'aclonifen déposé sur disques foliaires de colza à A= partir d'une solution aqueuse vraie à 265 ng/ml et de matière active à partir de suspensions aqueuses. B = 4,5 mg/ml (demi-dose agronomique), C = 9 mg/ml (dose agronomique). AF = agents de formulation du Challenge 600, DMSO = diméthylsulfoxyde

2) Mouvement de l'aclonifen dans le disque de colza :

La molécule d'aclonifen ayant une forte lipophilie on est en droit d'imaginer son stockage, après dépôt foliaire, dans la zone apoplastique lipophile qu'est la cuticule de l'épiderme supérieur des feuilles de colza.

Pour se placer dans les meilleures conditions de pénétration nous avons choisi d'effectuer des dépôts (100 µl/disque) d'une solution aqueuse vraie d'aclonifen (265 ng/ml) contenant 1,5% d'adjuvants de formulation. L'expérimentation est stoppée au bout de 2 heures. La répartition de la radioactivité dans les différents compartiments est présentée figure III 10.

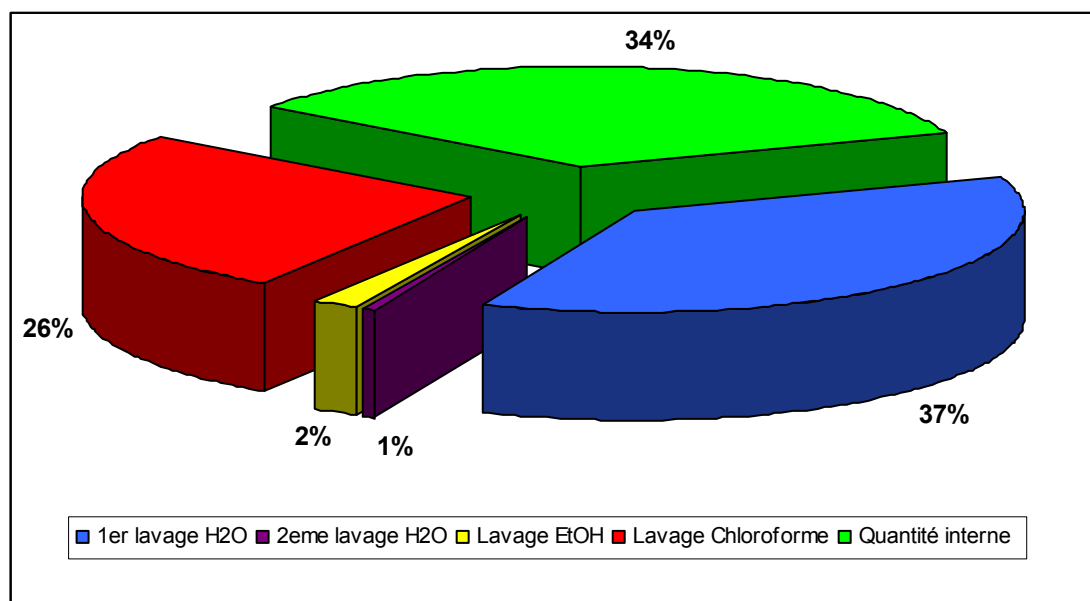


Figure III, 10 : Répartition (en %), après 2 h d'expérimentation, de l'aclonifen déposé sur disques foliaires de colza à partir d'une solution aqueuse contenant 1,5% d'adjuvants de formulation du Challenge 600 et 265 ng/ml de matière active marquée au ^{14}C .

Les rinçages classiques ont été effectués avec les résultats suivants : 1^{er} rinçage à l'eau = 37% de la quantité déposée, 2^{ème} rinçage à l'eau = 1% du dépôt, 3^{ème} rinçage à l'éthanol = 2% soit un total de 40% qui est resté sur la feuille. 60% se retrouvent à l'intérieur du disque (valeur proche des 69% trouvés dans une autre expérimentation, voir tableau III, 11). 26% de la quantité déposée se retrouvent dans la cuticule (quantité extraite par le rinçage au chloroforme) tandis que 34% ont rejoint les zones plus internes (fraction retrouvée dans les disques par minéralisation). Ainsi, la cuticule apparaît comme une zone transitoire de stockage de la matière active biodisponible avant que les phénomènes de diffusion et partition conduisent la matière active dans d'autres compartiments de la feuille.

3) Mesure des concentrations internes obtenues dans les disques foliaires de colza :

Les taux de radioactivité mesurés dans les disques foliaires de colza peuvent être ramenés à des teneurs d'aclonifen par unité de masse sèche. Les valeurs de masses fraîches et de masses sèches ont été mesurées sur un échantillon de 30 disques foliaires échantillonnés comme ceux ayant servi aux expérimentations de pénétration : masse fraîche d'un disque = $141,7 \pm 7,39$ mg et masse sèche (après 24h à 80°C) = $12,75 \pm 0,8$ mg (n = 30 disques).

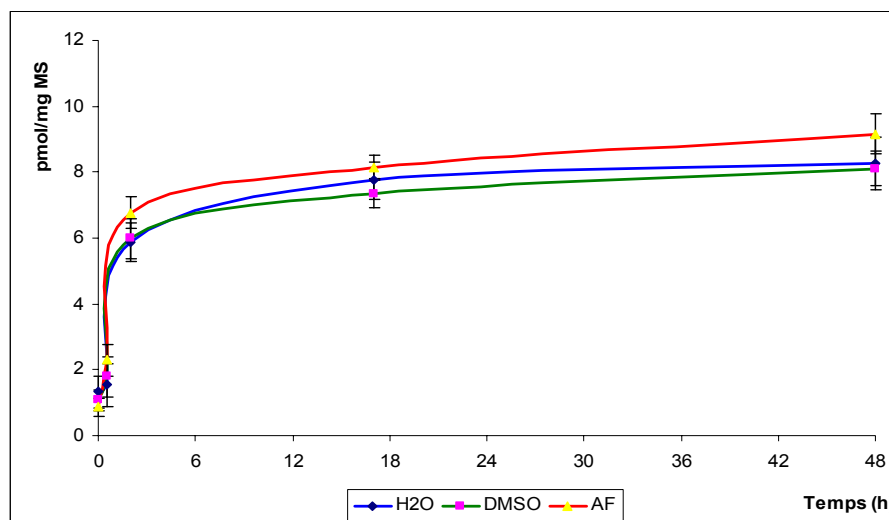


Figure III, 11 : Concentrations internes mesurées dans des disques foliaires de colza traités par dépôt de gouttes de solution aqueuse contenant 265 ng/ml d'aclonifen marqué au ^{14}C . Evolution durant 48 h. Les 3 courbes représentent 3 formulations différentes : eau seule, eau +1% DMSO, eau + 1,5% d'agents de formulation du Challenge 600. MS = masse sèche.

Dans les conditions expérimentales représentées figure III, 11, les concentrations internes apparaissent très semblables quelque soient les conditions de formulation. Un état d'équilibre semble atteint à partir de 24 h d'expérimentation, cet état d'équilibre est de l'ordre de 7 pmoles/mg de masse sèche (soit 35 pmoles/g de masse fraîche – 95% d'eau - correspondant à environ 35 pmoles/ml de volume foliaire 1 g de masse fraîche étant considéré comme 1 ml de volume de masse fraîche). Soit une concentration interne de 35 nM.

Avec des traitements à demi-dose agronomique (4,5 mg/ml, figure III, 12 A), les concentrations internes maximales atteintes (entre 24 et 48 h) avec l'eau comme solvant et l'eau + 1% DMSO sont très voisines de l'ordre de 2-3 nmoles/mg de masse sèche soit environ 15 nmoles/ml de volume foliaire ([15 μM]).

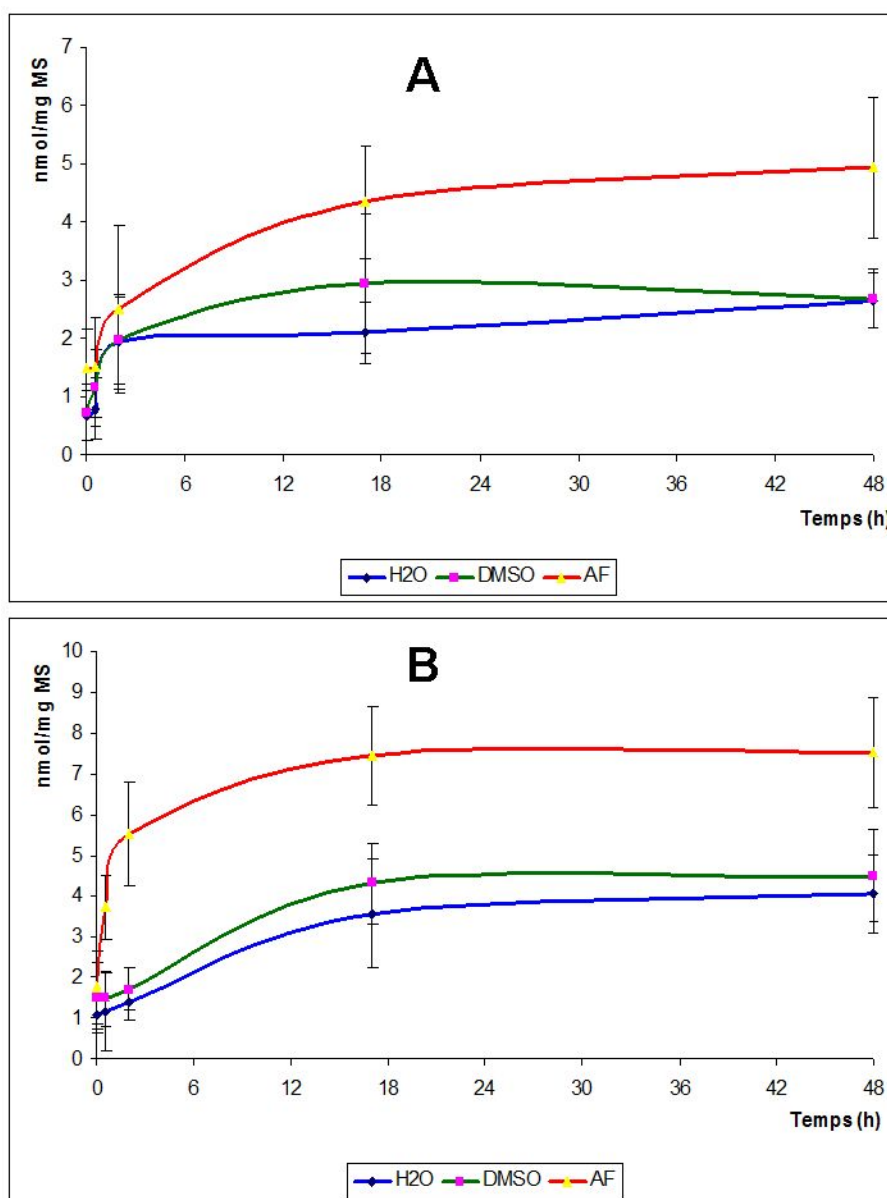


Figure III, 12 : Concentrations internes mesurées dans des disques foliaires de colza traités par dépôt de gouttes de suspension aqueuse contenant 4,5 mg/ml d'aclonifen (demi dose agronomique) et 9 mg/ml d'aclonifen (dose agronomique). Evolution durant 48 h. Les 3 courbes représentent 3 formulations différentes : eau seule, eau + 1% DMSO, eau + 1,5% d'agents de formulation du Challenge 600.

La présence de 1,5% d'adjuvants de formulation augmente cet état d'équilibre de façon conséquente, l'équilibre étant atteint aux alentours de 5 nmoles/mg de masse sèche (30 à 50% d'augmentation par rapport à la situation de formulation « eau » ou « eau + DMSO »), soit environ 25 nmoles/ml de volume foliaire ([25 μ M]).

Avec les traitements à dose agronomique (9 mg/ml, figure III, 12 B) la situation est assez semblable à celle obtenue avec une demi-dose de traitement. Les concentrations internes en présence de DMSO ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec l'eau seule et l'effet adjuvants de formulation est retrouvé. Dans cette dernière situation la teneur

interne est de 7 nmoles/mg de matière sèche soit 50% de plus qu'avec la demi-dose (soit 35 nmol/ml de volume foliaire d'où une concentration foliaire de [35 μ M]). Cet état est obtenu dès 24 h d'expérimentation. Cette situation correspond, dans nos conditions expérimentales, au maximum de pénétration dans les disques foliaires de colza : [35 μ M].

4) Evolution du taux de pénétration dans les fragments foliaires de vulpin :

La pénétration de l'aclonifen à partir d'une solution aqueuse vraie (265 ng/ml) dans des fragments foliaires de vulpin apparaît bien plus difficile que celle observée avec les disques foliaires de colza. En effet, dans le cas du colza, plus de 60% de la quantité déposée avait pénétré au temps 2 h (tableau III, 11). Avec le vulpin, la pénétration à T 2h ne dépasse pas 10% dans le meilleur des cas (présence d'agents de formulation) et représente 25% à T 48h pour les formulations « eau seule » et « eau + DMSO 1% ». La situation de pénétration la plus efficace sur vulpin reste la formulation avec les agents de formulation du Challenge 600 et atteint un maximum de 35% de pénétration à T 48h. Dans les mêmes conditions expérimentales, la pénétration sur feuilles de colza était de 95%. Les cinétiques de pénétration dans les fragments de feuilles de vulpin sont présentées figures III, 13.

Une des raisons possibles expliquant la différence de pénétration entre les deux espèces végétales peut être la différence d'aspect de surface et de composition des deux types de cuticules. Ces différences de caractéristiques physiques et/ou chimiques peuvent amener à des contacts entre goutte de dépôt et surface cuticulaire très différents jouant sur les surfaces de pénétration et par voie de conséquence sur les flux.

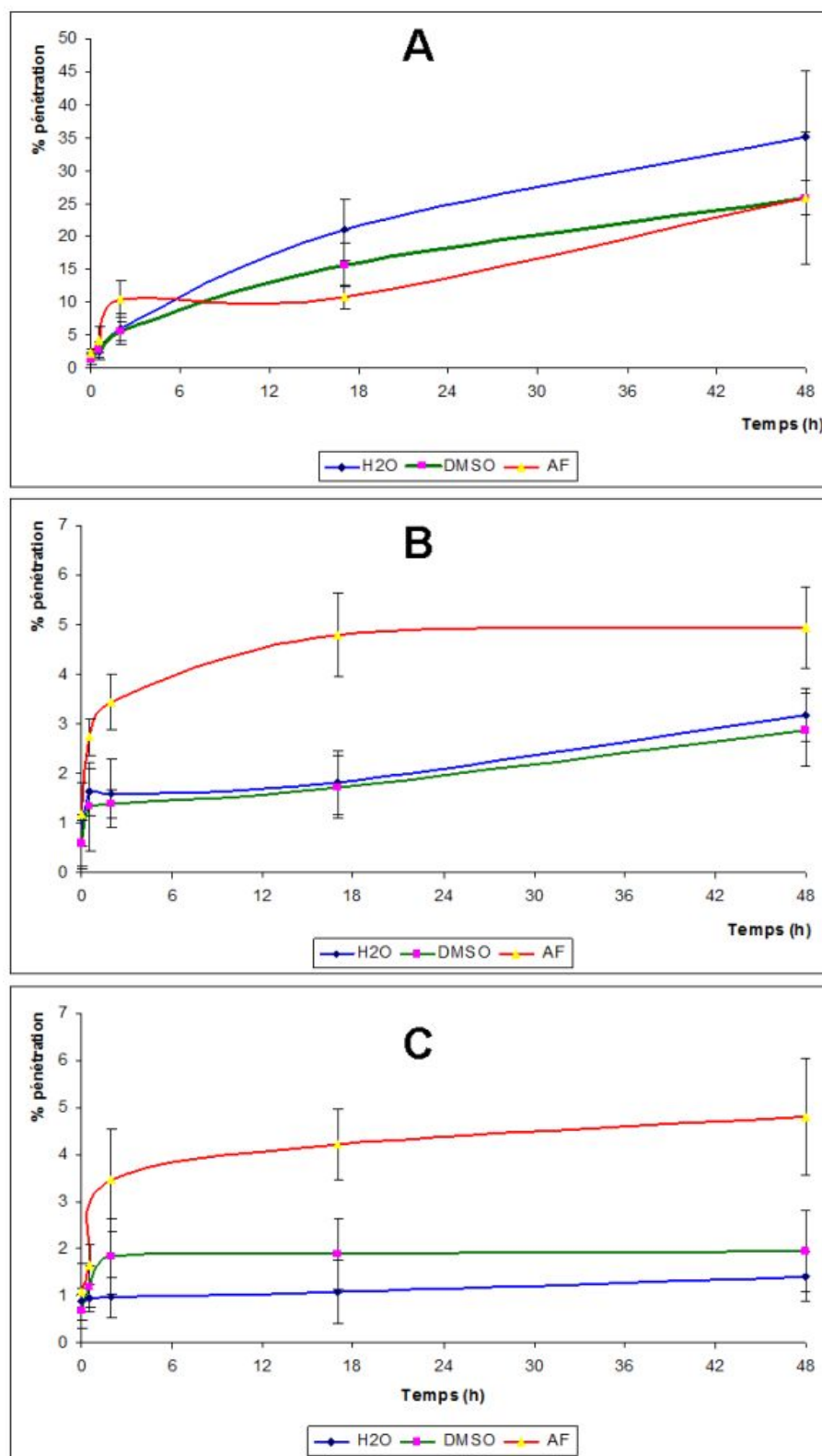


Figure III, 13 : Pourcentage de pénétration en fonction du temps de l'aclonifen déposé sur disques foliaires de vulpin à A= partir d'une solution aqueuse vraie à 265 ng/ml et de matière active à partir de suspensions aqueuses. B = 4,5 mg/ml (demi-dose agronomique), C = 9 mg/ml (dose agronomique). AF = agents de formulation du Challenge 600, DMSO = diméthylsulfoxyde.

Dans les cas de mise en œuvre de suspensions aqueuses (eau, eau + DMSO, eau + agents de formulation), les résultats de % de pénétration entre vulpin et colza sont assez semblables à 48 h (tableau III, 12). Le maximum de pénétration est obtenu avec l'emploi d'agents de formulation et représente environ 5% de la quantité déposée.

Tableau III, 12 : Comparaison des pourcentages de pénétration de l'aclonifen dans des fragments foliaires de vulpin et colza (à T = 48 h). A = solution aqueuse (265 ng/ml), B = suspension aqueuse (4,5 mg/ml), C = suspension aqueuse (9 mg/ml). DMSO = diméthylsulfoxyde (1%), AF = agents de formulation Challenge 600 (1,5%). T=Traitement

T	A + H ₂ O	A + DMSO	A + AF	B + H ₂ O	B + DMSO	B + AF	C + H ₂ O	C + DMSO	C + AF
Vulpin	35,2± 1,0	26± 2,5	25,9± 1,0	3,2± 0,6	2,9± 0,7	4,9± 0,8	1,4± 0,5	2± 0,9	4,8± 1,2
Colza	80,6± 8,2	83,1± 5,4	93,8± 6,1	2,6± 0,5	2,6± 0,5	4,8± 1,2	2± 0,5	2,2± 0,5	3,6± 1
<i>Quantité (ng) pénétré par cm²</i>									
Vulpin	1,2± 0,04	0,86± 0,08	0,86± 0,03	1800± 337,5	1631± 393,8	2756,3± 450	1575± 562,5	2250± 1012,5	5400± 1350
Colza	5,43± 1,7	5,44± 1,15	3,37± 1,47	3000± 300	3000± 300	5538,5± 1500	4615,4± 300	5076,9± 300	8307,7± 900

5) Mesure des concentrations internes obtenues dans les fragments foliaires de vulpin :

Les valeurs de concentrations internes obtenues dans les fragments foliaires de vulpin suite aux différents traitements appliqués sont indiquées dans les figures III, 14, 15, 16.

Dans cette situation de solution vraie déposée sur les feuilles, la concentration interne obtenue à 48 h est à peu près 2 fois plus forte dans le colza (figure III, 11) que dans le vulpin. Ceci s'explique sans doute par la pilosité de vulpin qui abaisse la surface de contact entre les gouttes et la cuticule. Les quantités pénétrées en fonction de la dose (situation A, B, C) sont évidemment plus forte en C qu'en A.

A 48h, on obtient ainsi une situation comparable à celle de la pénétration racinaire. Chez le colza, la quantité pénétrée en 48h pour A est 2465 fois inférieure à celle pénétrée en C. Si on considère les cinétiques, une proportion majeure a pénétré au cours des 6 premières heures.

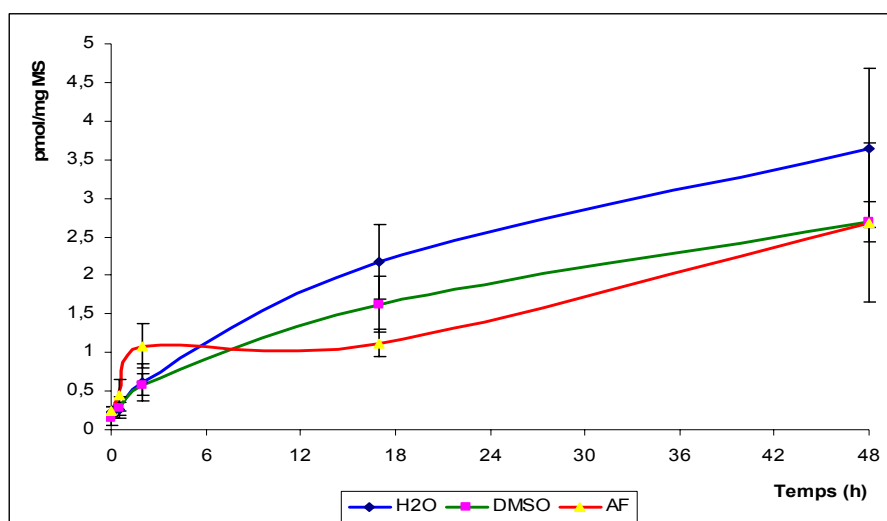


Figure III, 14 : Concentrations internes mesurées dans des fragments foliaires de vulpin traités par dépôt de gouttes de solution aqueuse contenant 265 ng/ml d'aclonifen marqué au ^{14}C . Evolution durant 48 h. Les 3 courbes représentent 3 formulations différentes : eau seule, eau + 1% DMSO, eau + 1,5% d'agents de formulation Challenge 600.

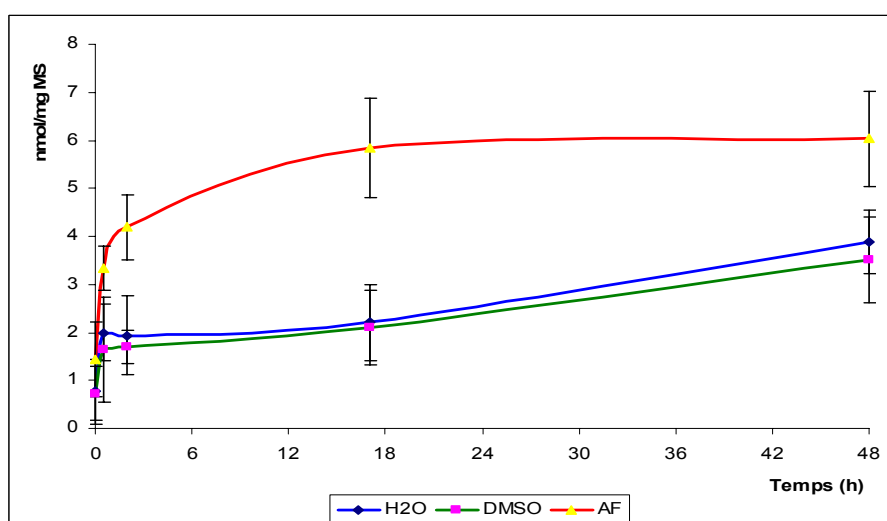


Figure III, 15 : Concentrations internes mesurées dans des fragments foliaires de vulpin traités par dépôt de gouttes de suspension aqueuse contenant 4,5 mg/ml d'aclonifen. Evolution durant 48 h. Les 3 courbes représentent 3 formulations différentes : eau seule, eau + 1% DMSO, eau + 1,5% d'agents de formulation Challenge 600.

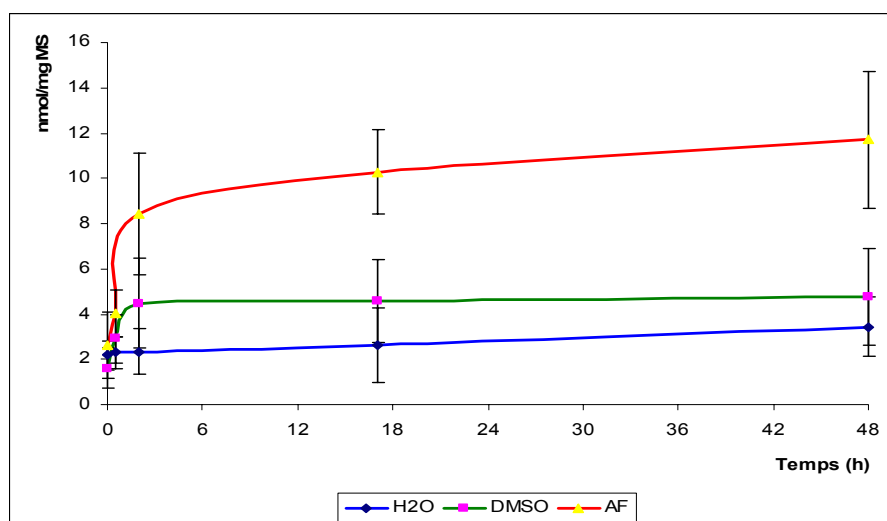


Figure III, 16 : Concentrations internes mesurées dans des fragments foliaires de vulpin traités par dépôt de gouttes de suspension aqueuse contenant 9 mg/ml d'aclonifen. Evolution durant 48 h. Les 3 courbes représentent 3 formulations différentes : eau seule, eau + 1% DMSO, eau + 1,5% d'agents de formulation Challenge 600.

Avec la dose de 4,5 mg/ml, la concentration interne dans les fragments de vulpin est très faible avec l'eau comme seul solvant. La présence de 1% de DMSO conduit à une concentration interne de 3,9 nmoles/mg de masse sèche, soit une situation à peu près identique que celle obtenue avec l'eau seule. Cette concentration est pratiquement doublée avec les agents de formulation (6 nmoles/mg de masse sèche, soit 30 μ M).

Avec la dose agronomique de traitement (figure III, 16), les concentrations internes sont en augmentation par rapport au traitement demi-dose et les concentrations internes sont dans l'ordre de 3,5 nmoles/mg de masse sèche avec l'eau seule, de près de 5 nmoles/mg de masse sèche avec 1% de DMSO et de 12 nmoles/mg de masse sèche (60 μ M) avec les agents de formulation. (figure III, 15). La comparaison des résultats expérimentaux entre pénétration foliaire chez le colza et le vulpin montre une situation compliquée légèrement plus favorable à la pénétration chez le colza (Tableau III, 8). Par contre, les concentrations internes obtenues en particulier avec les agents de formulations sont plus fortes chez le vulpin. En considérant que les fragments foliaires de vulpin ont le double de surface que les disques de colza pour un dépôt quantitativement identique, on observe à la demi-dose agronomique (25 μ M) chez le colza pour (60 μ M) chez le vulpin, et, à la dose agronomique (35 μ M) chez le colza et (120 μ M) chez le vulpin. Cela démontre la résistance possible du vulpin à l'aclonifen du faite d'une sélectivité de position mais aussi par possibilité d'une forte métabolisation au niveau foliaire.

Au total, la comparaison du comportement des feuilles de colza et de vulpin aux différents traitements proposés indique qu'en traitement foliaire le colza laisse pénétrer

l'aclonifen plus facilement que le vulpin ce qui laisse peu de place à la possibilité d'un traitement sélectif de post-levée sur colza avec Challenge 600. Avec les résultats obtenus nous ne pouvons cependant pas dire si les concentrations internes mesurées dans le colza sont phytotoxiques ou non car le temps d'exposition à l'herbicide est trop court (48 h) et le stock de pigments liés à l'acte photosynthétique élevé au départ de l'expérimentation.

Tableau III, 13 : Comparaison des concentrations internes en aclonifen obtenues dans des fragments foliaires de vulpin et colza à T = 48 h. A = solution aqueuse (265 ng/ml), B = suspension aqueuse (4,5 mg/ml), C = suspension aqueuse (9 mg/ml). DMSO = diméthylsulfoxyde (1%), AF = agents de formulation (1,5%). Pour A, les valeurs sont exprimées en pmoles/mg MS et pour B et C en nmoles/mg MS.

T	A + H ₂ O	A + DMSO	A + AF	B + H ₂ O	B + DMSO	B + AF	C + H ₂ O	C + DMSO	C + AF
Vulpin	3,7 ±1,1	2,7 ±0,3	2,7 ±1,1	3,9 ±0,7	3,5 ±0,9	6,1 ±1	3,5 ±1,3	4,8 ±2,1	11,7 ±3
Colza	8,3 ±0,8	8,1 ±0,5	9,2 ±0,6	2,7 ±0,5	2,7 ±0,5	4,9 ±1,1	4,1 ±1	4,5 ±1,1	7,5 ±1,4

6) Mesure des concentrations internes obtenues dans des jeunes feuilles de tournesol :

Un troisième type foliaire a été utilisé pour évaluer la pénétration de l'aclonifen utilisé en post-levée : la jeune feuille de tournesol. Les feuilles utilisées sont celles de plantules âgées de 4 semaines. Elles ont une surface de 3,74 cm² (± 0,32) proche de celle obtenue avec les disques foliaires de colza (3,9 cm²). Les mêmes techniques de mise en survie (boîte de Pétri), de dépôt de gouttes de traitements, les mêmes concentrations que pour le colza et le vulpin ont été utilisées dans cette dernière expérimentation de pénétration.

Avant d'étudier la cinétique de pénétration dans toutes nos conditions de concentrations et d'adjuvants, nous avons recherché, à 24h, les taux de pénétration dans les différents cas expérimentaux et mesuré les concentrations internes obtenues afin de comparer les résultats à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec le colza (mêmes conditions, mêmes surfaces de traitement).

Les résultats de pénétration dans la feuille de tournesol sont présentés figure III, 17.

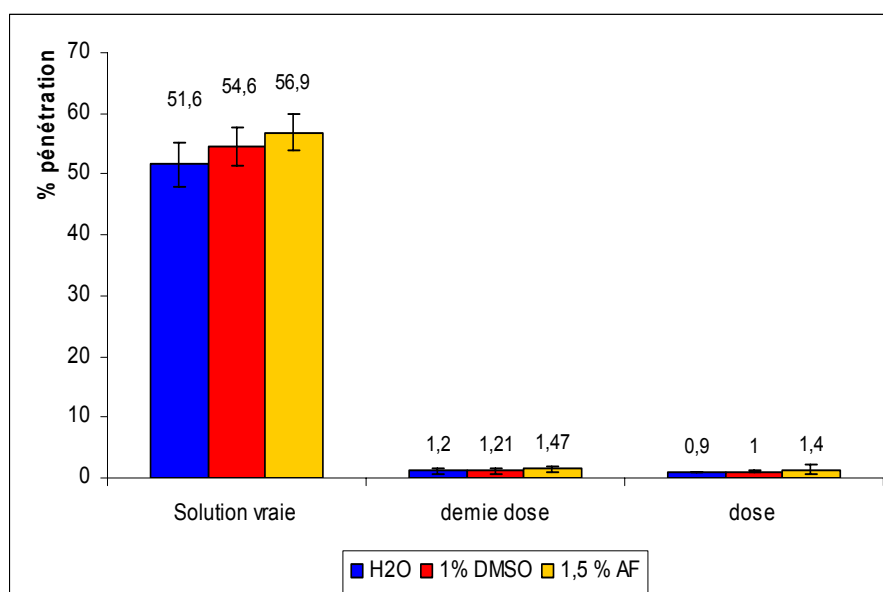


Figure III, 17 : Pourcentage de pénétration de l'aclonifen à 24h dans des feuilles de plantules de tournesol sur lesquelles a été déposé la matière active formulée dans l'eau, l'eau + 1% DMSO, et 1,5% d'adjuvants de formulation du Challenge 600. Les trois doses sont : 265 ng/ml « solution vraie », 4,5 mg/ml « demi-dose agronomique », et, 9 mg/ml dose agronomique ». Moyenne de 4 essais.

Dans les mêmes conditions expérimentales, les taux de pénétration chez le colza apparaissent significativement supérieurs (entre 30 et 50%) à ce qui est obtenu avec le tournesol. Les valeurs obtenues avec le colza (et présentées plus haut, tableau III, 6) sont, pour comparaison, remises en parenthèse ici : solution vraie : 51 (80), 54 (80), 57 (85), demi-dose : 1,2 (2), 1,2 (2,4), 1,5 (4,2), dose : 0,9 (1,7), 1 (2,1) 1,4 (3,6). La surface même de la feuille peut être un frein à la pénétration, la feuille de tournesol apparaît très rêche et pileuse, par rapport à un colza dont la surface cuticulaire est beaucoup plus lisse.

En ce qui concerne les valeurs de concentrations internes obtenues à 24 h, les résultats sont les suivants : pour la concentration la plus faible en aclonifen (nommée « solution vraie »), il n'y a pas de différences significatives suivant les adjuvants employés, la concentration mesurée est située entre 10 et 11 pmoles/mg MS. Si on compare avec le colza traité de la même manière (figure III, 10) on retrouve des valeurs semblables voisines de 9-10 pmoles/mg MS. Les résultats pour les doses plus fortes sont présentés figure III, 18.

Il est intéressant de donner la [C] par mg de masse fraîche ce qui donne à peu près la concentration apparente interne et permet d'exprimer le rapport $[C]_{\text{interne}}/[C]$ dans le goutte de traitement.

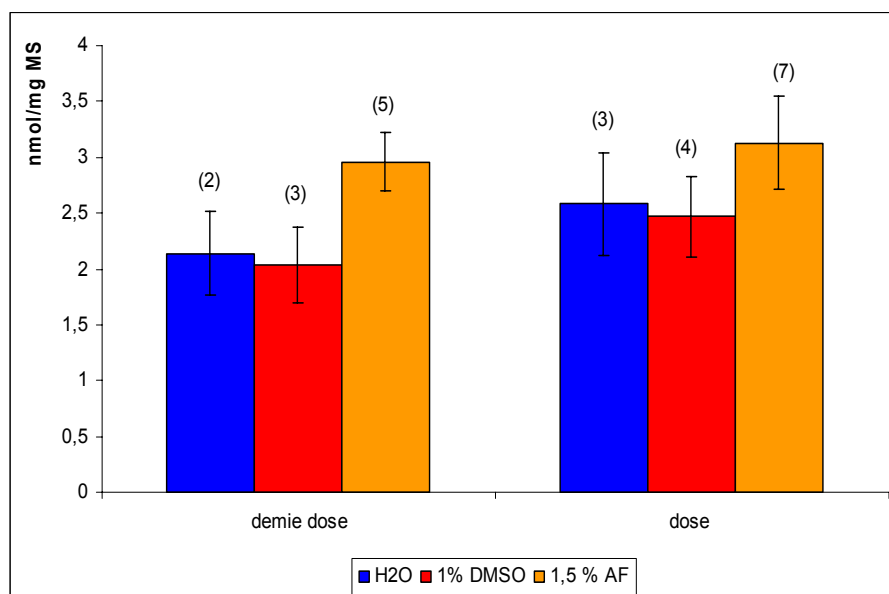


Figure III, 18 : Concentrations internes en aclonifen (nmol/mg MS) à 24h dans des feuilles de tournesol traitées en dépôt de gouttes formulées différemment : eau seule, eau + 1% DMSO, eau + 1,5% d'adjuvants de formulation Challenge. Les doses en aclonifen sont de 4,5 mg/ml (demi-dose) et de 9 mg/ml (dose). Les valeurs indiquées en parenthèses sont celles obtenues avec des disques foliaires de colza dans les mêmes conditions expérimentales (voir figure III, 12).

Les résultats de concentrations internes, à 24h, dans les feuilles de tournesol sont, dose par dose et adjuvant par adjuvant, extrêmement proches des résultats obtenus avec les disques foliaires de colza.

Pour suivre la cinétique de pénétration de l'aclonifen dans les feuilles de tournesol nous avons choisi de n'utiliser que les deux doses réalistes en agriculture (demi-dose et dose) en présence des agents de formulation contenus dans la formulation Challenge. Les résultats comportant cinq réplicats sont présentés figure III, 19.

Dans les deux cas de dosage les équilibres de pénétration conduisent à des courbes d'allure très semblable : une forte pénétration durant les 4-5 premières heures de contact assurant une concentration interne comprise entre 2 et 7 nmole/mg MS chez le colza suivant la dose appliquée. La pénétration entre 12 et 48 h devient faible à très faible (de l'ordre de 0,15 nmol/mg MS/j. pour la demi-dose de traitement et de 0,25 nmol/mg MS/j. pour la dose complète). A la fin de l'expérimentation (48 h), les concentrations internes sont voisines de 2 nmol/mg MS ([2 μ M]) pour la demi-dose de traitement, et de 3,7 nmol/mg MS ([3,7 μ M]) pour la dose totale. Ces deux dernières valeurs sont nettement inférieures aux valeurs obtenues (à 48h, figure III, 13) dans les mêmes conditions avec les disques foliaires de colza : 5 nmol/mg MS pour la $\frac{1}{2}$ dose et 7 nmol/mg MS pour la dose totale. La pilosité et la

géométrie, de la surface foliaire du tournesol peuvent, au moins en partie, être à l'origine du différentiel de concentration interne observé entre le colza et le tournesol.

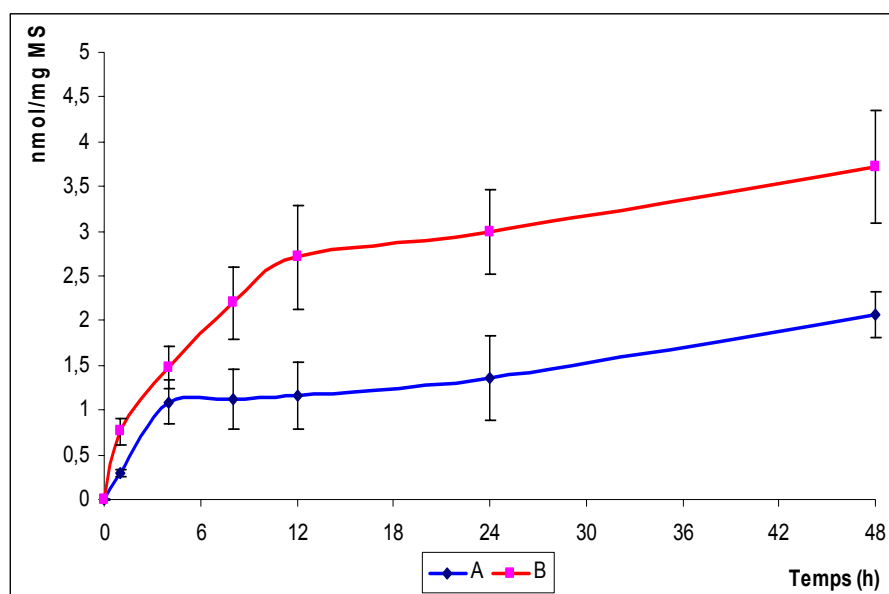


Figure III, 19 : Cinétique de la pénétration de l'aclonifen dans des feuilles de tournesol après application de la matière active à 4,5 mg/ml (A : demi-dose agronomique) et à 9 mg/ml (B : dose agronomique). Les valeurs indiquées représentent des concentrations internes (nmoles/mg de masse sèche ou μM). Chaque courbe présentée est la moyenne de 5 réplicats.

C) Conclusions :

Le contenu du chapitre III résume nos différentes expérimentations concernant les voies de pénétration de l'aclonifen dans la plante. Utilisé majoritairement en pré-levée, il était logique dans un premier temps de s'intéresser à la pénétration par le système racinaire. Cependant, bien que cette matière active soit principalement formulée pour des traitements de pré-levée (SC commerciale Challenge 600), nous avons tenté de comprendre si, une telle formulation non adaptée au traitement foliaire conduirait malgré tout ou non à une pénétration cuticulaire et une distribution interne (épiderme supérieur, parenchyme chlorophyllien porteur des zones biochimiques cibles de l'aclonifen).

Pénétration racinaire. Chez le blé cultivé sur sable pendant un mois, avec une faible concentration en herbicide (250 nM) totalement solubilisé dans l'eau, la disponibilité de la matière active paraît totale et les concentrations racinaires en fonction du temps semblent correspondre à chaque temps de mesure, à des équilibres de partition/diffusion entre solution du sol et parties racinaires (coefficient voisin de 60 à l'équilibre de partition). Le coléoptile de blé, qui représente un tout petit espace biologique (6 mg de masse fraîche), se charge très fortement (environ 7 fois la concentration dans l'eau du substrat à 28 jours) pour des raisons de « chromatographie à eau perdue » de cet organe sans protection contre les pertes d'eau. Il

convient de noter que cet organe de très petite taille ne capture, malgré le facteur de concentration de 7, que des quantités minimales d'herbicide. Dans l'espace foliaire, la teneur de l'herbicide augmente progressivement au cours du temps. À 7 jours de culture la concentration mesurée dans les feuilles (116 pmoles/g de MF) ne représente que 75% de la valeur calculée (volume d'eau transpirée x la concentration dans l'eau du substrat). Cela tend à indiquer que la matière active suit le flux d'eau mais ne migre pas, dans la plante, à la vitesse de l'eau transpiratoire. La lignine des vaisseaux de bois dont le caractère est lipophile doit freiner la migration de l'herbicide assez largement lipophile. Malgré ce frein à la mobilité, celle-ci se poursuit dans le temps, la concentration foliaire progresse entre 7 j et 28 j (augmentation totale de + 475%). En fin d'expérience (28 j), le facteur de concentration entre l'espace foliaire (1 g de MF) et l'eau du substrat (1 ml) est de l'ordre de 200 lié au dépôt foliaire d'une eau contaminée qui s'évapore. Ainsi, à partir d'un compartiment donneur (substrat/eau/herbicide), l'acétonifène par le système racinaire charge lentement mais sûrement l'espace cible (l'espace chloroplastique) en fonction de la disponibilité dans l'eau des molécules d'acétonifène solubilisées. À 28 j de culture, le blé a absorbé 4,3% de la dose appliquée au sol, dont plus de 40% de la matière active est localisée dans les feuilles.

La pénétration de l'acétonifène dans des racines isolées de maïs ne semble pas très rapide malgré des conditions de pénétration optimales (contact total et biodisponibilité maximale). Sur trois jours d'expérimentation le facteur de partition entre l'espace racinaire et l'espace aqueux donneur d'acétonifène passe de 6 à 80 entre le temps 30 min et 72 h. À l'équilibre de partition, à la dose agronomique de traitement, la concentration interne est voisine de [30 µM] soit près de 30 fois la concentration initiale de traitement. En utilisant la valeur mesurée de concentration dans l'eau de traitement et en tenant compte du log de partition octanol/eau mesuré par nos soins (= 3,7) et celui mesuré par Rhône-Poulenc (= 4,37), nous avons calculé pour les racines de maïs, le facteur de partition théorique : 60 (avec log P = 3,7) et 300 (avec log P = 4,37). C'est la valeur de log P de 3,7 qui donne la partition la plus proche de celle mesurée. Le fait que la valeur de partition mesurée monte jusqu'à 80 (à 72 h) est peut-être directement liée au fait que le maïs de plein champ (aux doses homologuées) tolère l'acétonifène par des mécanismes probables de métabolisation au niveau racinaire. Une telle métabolisation (qui semble réaliste chez le maïs) change bien évidemment les règles de partition, en favorisant clairement un stockage des métabolites hydrophiles dans les zones hydrophiles de la plante.

La tolérance à l'acétonifène du tournesol en usage agricole est encore plus marquée que celle du maïs. C'est peut-être là encore des processus racinaires de métabolisation qui sont à l'origine

d'une partition de l'aclonifen plus forte que dans les deux plantes précédemment étudiées. En effet, la partition mesurée dans des racines de tournesol est déjà de 90 à 24 h alors qu'elle n'atteint que 80 à 72 h chez le maïs. Nous pensons que ces résultats sont la résultante de phénomènes de métabolisation transformant l'aclonifen en produits plus polaires (changement de lieux de stockage) et que l'activité métabolique est plus forte chez le tournesol que chez le maïs. Par ailleurs, il peut y avoir une différence de partition liée à la teneur en lipides.

Pénétration foliaire. La logique de la pénétration foliaire (traitement de post-levée) est d'essayer, contrairement au traitement de pré-levée, de faire entrer dans l'organisme végétal, le plus rapidement possible (quelques heures) le maximum de matière active avant que la goutte de traitement ne sèche complètement (entraînant la cristallisation et l'indisponibilité de la matière active). Pour réaliser de tels traitements ce sont des concentrés émulsionnables (CE) qui sont la plupart du temps commercialisés (matière active sous forme solubilisée dans un solvant lipophile et peu volatil + adjuvants). Dans ces conditions, le Challenge 600 ne répond pas à ces caractéristiques et par conséquent ne semble pas bien adapté pour réaliser du désherbage de post-levée (Gauvrit, 1995 ; Cabanne et Gaudry, 1995). C'est ce que nous avons voulu vérifier en mesurant la pénétration foliaire de l'aclonifen sur des disques foliaires prélevés sur colza et sur fragments foliaires d'un des adventices majeurs de cette culture : le vulpin, mais aussi sur tournesol parfois traité en plein champ avec l'aclonifen en post-levée. Trois situations de formulation ont été étudiées : l'eau comme seul solvant, l'eau + 1% de DMSO, l'eau + 1,5% d'agents de formulation du Challenge. Si l'expérimentation sur colza démontrait qu'il existe chez cette espèce, une forte barrière à la pénétration de l'herbicide et qu'une telle barrière n'existe pas sur les adventices de cette culture, alors s'ouvrirait un champ de sélectivité à la pénétration qui peut avoir un intérêt agronomique.

L'ensemble de ces expérimentations sur fragments foliaires de colza, de tournesol et de vulpin a été conduit sur une période de 48 h. Ce temps est trop court pour pouvoir détecter sur les fragments foliaires des symptômes éventuels de phytotoxicité. Deux doses réalistes au plan agronomique (1/2 dose agronomique soit 4,5 mg/ml et dose agronomique soit 9 mg/ml) ont été comparées (il s'agit de suspensions de cristaux, observés en microscopie, figure III, 20).

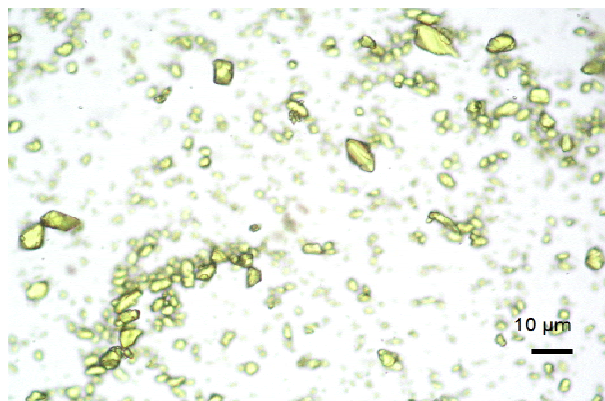
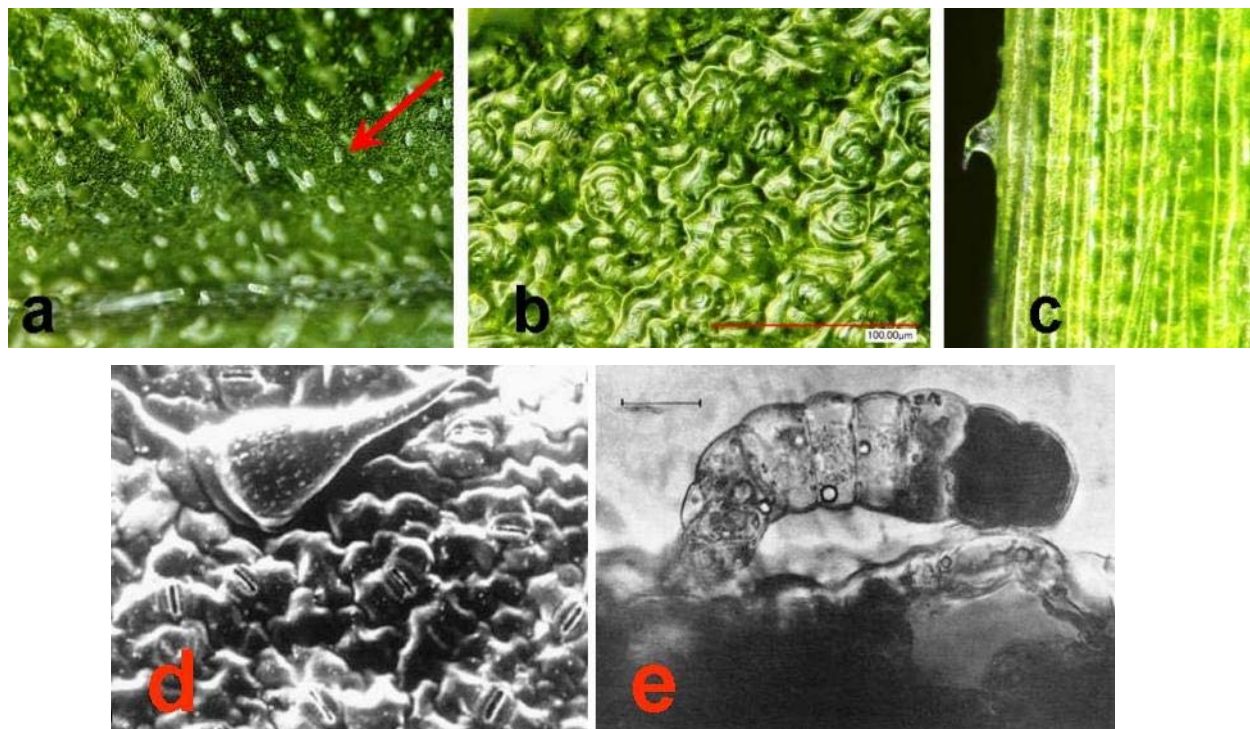


Figure III, 20 : Cristaux d'aclonifen purs observés au microscope (x 400).

En 48 h, 2 à 4% de la matière active déposée rentrent dans les fragments, cette pénétration est déjà presque à l'équilibre après 24 h de contact. Les quantités pénétrées représentent 3 (1/2 dose) et 5 nmoles/mg de MS (dose entière) avec le DMSO et 5 (1/2 dose) et 8 nmoles/mg de MS avec 1,5% d'adjuvants de formulation soit une concentration interne de 25 μ M à la demi-dose et 35 μ M à la dose entière. Avec des expériences complémentaires nous avons vérifié que l'essentiel de ce qui entre dans l'espace feuille est situé dans la zone symplasmique de la feuille et non dans l'espace cuticulaire. Toutes choses étant égales par ailleurs, si l'on compare la pénétration dans le vulpin et dans le colza (ex. pleine dose additionnée des agents de formulation Challenge) on s'aperçoit que (à 24h) dans le vulpin la concentration interne avec la 1/2 dose est de 30 μ M et à la dose entière de 60 μ M. Ainsi, le vulpin, par pénétration foliaire atteint une concentration interne plus forte que le colza mais ce n'est pas pour autant que le vulpin montre des signes de phytotoxicité. L'aspect et la composition chimique de la cuticule sont peut être à l'origine de cette différence vulpin/colza.

Si enfin, on compare la situation à 24h avec les traitements demi-dose et pleine dose appliquée sur tournesol, on s'aperçoit 1) que la pénétration est plus rapide chez le tournesol mais que les concentrations internes à 24 h sont nettement plus faibles (15 μ M à la demi-dose et 16 μ M à la dose entière). La structure même de la feuille est très poilue (Spring et al., 1992 ; Hernández et al., 1999 ; Singh et Sinha, 2004, figure III, 21) pourrait être à même de piéger à l'extérieur une partie du produit de traitement dont les gouttes en perdant leur solvant laisseraient la matière active cristallisée et indisponible.

L'ensemble de ces expérimentations sur fragments foliaires a été conduit sur une période de 48 h. Ce temps est trop court pour pouvoir détecter sur les fragments foliaires des symptômes éventuels de phytotoxicité. Deux doses réalistes au plan agronomique (1/2 dose agronomique soit 4,5 mg/ml et dose agronomique soit 9 mg/ml) ont été comparées (il s'agit de suspensions de cristaux, vérifié en microscopie).



(d'après Singh et Sinha, 2004, 400X)

(d'après Spring et al., 2004, barre : 10 μ m)

Figure III, 21 : Photographies de surfaces foliaires : a) tournesol avec poils glandulaires (flèche) x 100, b) colza x 100 c) vulpin x100. d) tournesol x400et e) poil glandulaire de tournesol (microscopie électronique). a, b, et c images obtenues par microscopie (Keyence microscope, résolution de 16 bits. Série VHX-1000)

Avec des expériences complémentaires nous avons vérifié que l'essentiel de ce qui entre dans l'espace feuille est situé dans la zone symplasmique de la feuille et non dans l'espace cuticulaire. Toutes choses étant égales par ailleurs, si l'on compare la pénétration dans le vulpin, dans le colza et le tournesol (ex. pleine dose additionnée des agents de formulation Challenge) on s'aperçoit que les quantités pénétrées dans le vulpin sont plus fortes que celles introduites dans le colza. C'est le tournesol, toutes choses étant égales par ailleurs, qui accumule le moins.

Les possibilités de métabolisation ne doivent pas être écartées. Elles vont dans l'autre sens : la métabolisation devrait faire pénétrer plus.

Au total, l'éventualité d'une sélectivité du colza vis-à-vis du vulpin en traitement de postlevée, même avec une formulation plus adaptée que Challenge 600 apparaît illusoire.

CHAPITRE IV : MESURE DE LA PARTITION DE L'ACLONIFEN ENTRE L'EAU ET DIFFERENTS SOLS et SUBSTRATS.

I) Partition de l'aclonifen entre l'eau et différents types substrats :

Le but de cette étude est de mesurer et de suivre sur une période longue, l'évolution de la teneur en aclonifen dans l'eau retenue par divers substrats jouant le rôle de sol. En effet, dans le cas d'un traitement de pré-levée, c'est la disponibilité dans l'eau du sol d'une matière active qui est à la base de la réussite du traitement car c'est, en fin de compte, la matière active présente dans l'eau qui sera bio-disponible et transférable *via* la sève brute, vers les différentes parties de la plante traitée (dont celles qui contiennent la cible biochimique visée). A la date marquant la fin de notre expérimentation un bilan de dissipation de l'aclonifen entre les deux matrices (eau et substrat) est réalisé pour mettre en évidence et quantifier les éventuelles pertes et les éventuels résidus liés de manière irréversible aux substrats.

A) Matériel et méthodes

1) Substrats utilisés. Dans une première approche trois substrats différents ont été utilisés pour cette expérimentation de partition eau/substrat : 1) du sable considéré (à tort) comme sable de rivière, 2) un mélange de terre franche prélevée sur le campus de Grenoble (texture : argile 25%, limons 40% et sable 35%) et de sable de rivière (50/50), et enfin, 3) un mélange plus riche en matière organique composé de 40% de sable, 40% de terre franche et 20% de terreau horticole.

1a) Montage expérimental.

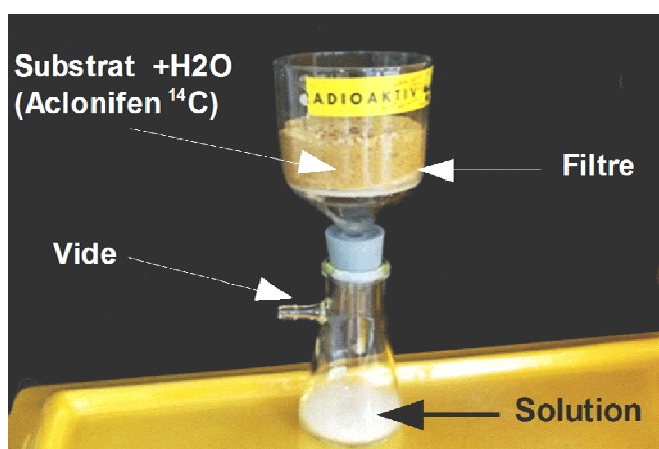


Figure IV, 1 : Dispositif expérimental pour la mesure de partition de l'aclonifen entre l'eau et un substrat. Durant toute l'expérimentation la partie en verre est recouverte d'un film d'aluminium (évite l'évaporation de l'eau et l'éventuelle photodégradation de l'aclonifen).

Afin de pouvoir récupérer à tout instant de l'eau du sol retenue par le substrat nous avons installé les différents substrats dans des entonnoirs à « verres frités » n° 1 type Büchner permettant d'appliquer sur le dispositif une aspiration modérée vers le bas autorisant ainsi une séparation propre eau-substrat (figure IV, 1). Après séparation des deux phases, 1 ml d'eau est prélevé pour en mesurer le contenu en aclonifen (comptage par scintillation). Toute l'eau restante (+ 1 ml compensateur de la prise pour la mesure) est remise sur le dispositif. Tout au cours de l'expérimentation (43 jours) chaque dispositif est recouvert de feuilles d'aluminium pour éviter les phénomènes d'évaporation du système et éventuellement ceux de photodégradation de la matière active. Ainsi, quatre dispositifs ont été installés en parallèle : le N° 1 avec 300 g de sable sec, le N° 2 avec 300 g de mélange déshydraté terre/sable, le N°3 avec 300 g du dernier mélange déshydraté (terre/terreau/sable), et le N° 4 de même composition que le N°3 mais avec une masse sèche plus importante : 500 g.

1b) Solution aqueuse de traitement. Les solutions aqueuses de traitement sont réalisées avec de l'eau distillée additionnée d'aclonifen marqué au ^{14}C . Les solutions vraies sont titrées à 150 000 dpm/ml (solution 1,5 μM , 1 nmole \approx 100 000 dpm). Chaque dispositif est arrosé avec une telle solution d'aclonifen jusqu'à atteindre la capacité au champ. Ainsi, le dispositif N°1 reçoit 70 ml (soit 10 500 000 dpm = 105 nmoles), le dispositif N°2 reçoit 110 ml (16 500 000 dpm = 165 nmoles), le dispositif N° 3 reçoit 140 ml (21 000 000 dpm = 210 nmoles) et enfin, le N°4 reçoit 220 ml (33 000 000 dpm = 330 nmoles).

1c) Cinétique de prélèvement. En plus d'un prélèvement à T0 (2 à 3 heures après le début de l'expérimentation), onze prélèvements ont été réalisés (notés T1 à T11) respectivement à 1, 2, 4, 8, 10, 14, 21, 33, 37, 41 et 43 jours.

A T11 (43 jours) tous les dispositifs expérimentaux sont soumis à un vide partiel poussé (figure IV, 2) afin d'extraire le maximum d'eau du substrat. La radioactivité de l'eau est mesurée. Le substrat essoré est extrait deux fois par 50 ml d'acétone. La phase hydro-acétonique récupérée est partagée (ampoule à décanter) deux fois contre de l'éther de pétrole (2 x 5 ml). Les phases hydro-acétoniques et éther de pétrole issues de ce partage sont comptées par scintillation, mais aussi soumises à chromatographie (sur plaque de silice avec comme solvant éther pétrole : dichloroéthane : acétate d'éthyle (3/1/1 : v,v,v). Les chromatogrammes réalisés sont alors observés au Phosphorimager pour qualifier et quantifier les éventuels métabolites de l'aclonifen. Une partie aliquote (1 g) de substrat ayant été traité par l'acétone est minéralisée (dans un dispositif clos) par 5 ml d'un mélange H_2O_2 , H_2O , acide perchlorique (1/1/1 : v, v, v) pendant une nuit en présence d'un récipient annexe

contenant 10 ml de KOH (M). Le $^{14}\text{CO}_2$ résultant de la minéralisation est piégé dans la solution KOH et compté en scintillation. Le reste du substrat subit une extraction à l'eau bouillante (200 ml) sous reflux pendant 3 heures. L'eau récupérée est comptée en scintillation. Le substrat résiduel subit sur une partie aliquote (1 g) une minéralisation pour comptage. Le reste du substrat provenant de l'extraction à l'eau chaude subit une extraction acide (HCl) sous reflux à chaud pendant 2 heures. La phase acide et le substrat sont à leur tour comptés en scintillation. L'ensemble de cette procédure parfois drastique est obligatoire si l'on veut quantifier de véritables résidus liés (c'est-à-dire

Protocole d'extraction de l'aclonifen retenu par le substrat (à 43 jours).

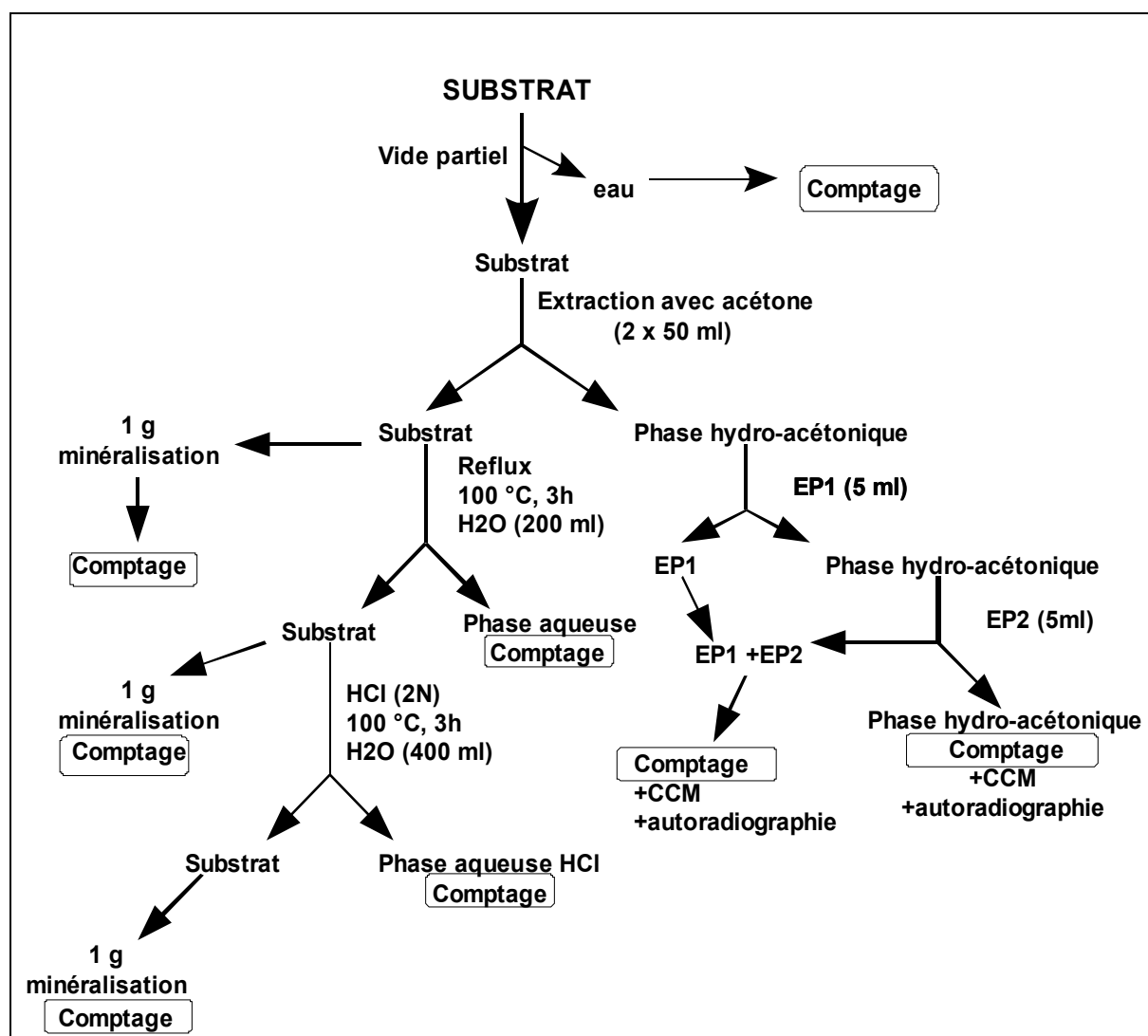


Figure IV, 2 : Protocole d'extraction de l'aclonifen restant dans le substrat en fin d'expérimentation (43 jours). EP = éther de pétrole, CCM = chromatographie sur couche mince.

C) Résultats.

1) Variations au cours du temps de la teneur en aclonifen marqué dans l'eau des différents substrats utilisés (tableau IV, 1)

Tableau IV, 1 : Evolution au cours du temps de la teneur en aclonifen dans l'eau en équilibre avec les différents substrats utilisés. Les valeurs sont exprimées en dpm/ml d'eau. N° 1 = sable, N° 2 = sable + terre (50/50), N° 3 = sable + terre + terreau (40/40/20), N°4 même composition que N°3 mais 500g de substrat sec au lieu de 300 g. Solution initiale : 150 000 dpm/ml.

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁
N° 1	7100	8846	9900	6900	6950	6414	5760	6610	6372	6305	6613	6473
N° 2	178	91	68	75	49	42	77	131	53	103	106	111
N° 3	577	84	68	33	16	45	45	44	35	33	33	33
N° 4	295	232	93	140	158	168	117	120	94	113	87	88

Les concentrations dans l'eau les plus fortes sont obtenues avec le sable comme unique substrat. La variation de concentration dans l'eau au cours du temps est faible et la moyenne des mesures est de l'ordre de 7020 dpm/ml sur la période étudiée (43 j), soit une solution à 0,07 μ M. Par rapport à la concentration en aclonifen de l'eau apportée (150000 dpm/ml), la concentration retrouvée n'est que de 5% de la concentration appliquée. Nous retrouvons avec le sable utilisé ici les mêmes difficultés qu'avec le sable utilisé en début de thèse, à savoir un sable adsorbant qui n'est pas un vrai sable de rivière composé de silice pure considérée comme non adsorbante. Ainsi, notre substrat sable utilisé ici n'est pas une référence de « sol » non-absorbant mais un intermédiaire entre silice et mélange terre/silice.

Dans les trois autres essais contenant de la matière organique (terre franche, terreau), les teneurs en aclonifen dans l'eau sont aussi très stables au cours du temps mais très nettement inférieures à celle de l'eau en partage avec le sable. Pour le substrat désigné N°2 (terre et sable) la teneur moyenne dans l'eau en aclonifen est de 90 dpm/ml (86 pM). La valeur est pratiquement identique avec le substrat désigné N°3 (87 dpm/ml soit une solution 83 pM) et enfin le substrat N°4 contient une moyenne de 142 dpm/ml ce qui correspond à une solution d'aclonifen à 0,14 nM.

L'ensemble des valeurs évolue très peu entre le début et la fin de l'expérimentation, ce qui autorise le calcul d'un facteur de partition entre l'eau et le substrat dans les 4 cas de figure expérimentés. Ce facteur de partition est le rapport, à l'équilibre, des concentrations mesurées dans un gramme de substrat et dans un gramme d'eau ([substrat]/[eau]). Les concentrations dans les substrats sont pratiquement égales aux quantités déposées divisées par la masse sèche

de substrat et la valeur dans l'eau est à chaque fois une moyenne des douze mesures. **Pour le sol N°1 ce rapport est de 5 (35000/7020), il est de 609 (55000/90) pour le sol N°2, de 803 pour le sol N°3 (70000/87) et de 464 pour le sol N°4 (66000/142).** Il existe une très grande différence entre le sable et les substrats contenant de la matière organique. La valeur de 5 pour le sable reflète une adsorption qui ne peut s'expliquer que par la présence dans le sable utilisé d'une fraction adsorbante inconnue. Les valeurs obtenues avec les autres sols sont élevées ce qui démontre une très forte capacité d'adsorption de l'aclonifen sur le complexe argilo-humique régulant la biodisponibilité de cette molécule dans l'eau.

2) Bilan du devenir de l'aclonifen après 43 jours de contact dans les différents substrats.

A 43 jours, les 4 échantillons utilisés sont débarrassés de leur fraction eau (aspiration sous vide), les substrats humides sont successivement extraits à l'acétone (fraction acétonique elle-même repartagée contre de l'éther de pétrole). Le substrat est alors soumis à une eau sous reflux (fraction eau à chaud). Enfin, le substrat est minéralisé (fraction minéralisation). Après l'utilisation de l'eau sous reflux un seul échantillon (N°2) a été soumis à un reflux dans HCl 2N sans grand succès.

N° 1 avec 10 500 000 dpm au départ. Situation à T11 (43 jours) :

- dans l'eau 460 950 dpm (**4,4 %**)
- dans l'acétone 4 000 000 dpm (**38 %**) 1 800 000 dans EP et 2 200 000 dans H₂O/acétone
- dans eau à chaud 1 800 000 dpm (**17 %**)
- dans substrat résiduel (minéralisation) 4 150 000 dpm (**39 %**)
- Total récupéré : **98,4 %**

N° 2 avec 16 500 000 dpm au départ. Situation à T11 (43 jours) :

- dans l'eau 12 200 dpm (**0,07 %**)
- dans l'acétone 5 960 000 dpm (**36 %**) 2 800 000 dans EP et 3 100 000 dans H₂O/acétone
- dans eau à chaud 2 850 000 dpm (**17 %**)
- dans HCl à chaud 100 000 dpm (**6 %**)
- dans substrat résiduel (minéralisation) 5 250 000 dpm (**32 %**)
- Total récupéré : **91 %**

N° 3 avec 21 000 000 dpm au départ. Situation à T11 (43 jours) :

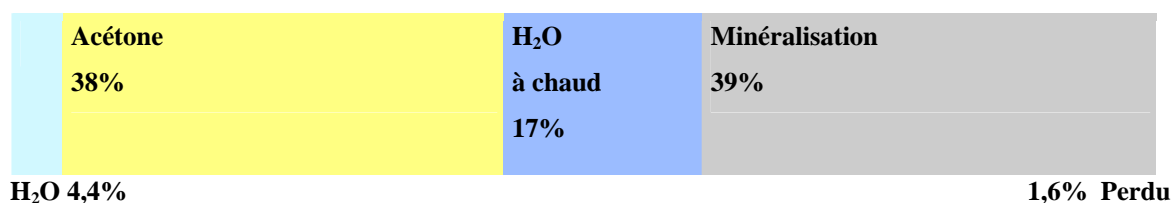
- dans l'eau 4620 dpm (**0,02 %**)
- dans l'acétone 13 210 000 dpm (**60 %**) 9 750 000 dans EP et 3 458 000 dans H₂O/acétone
- dans eau à chaud 7 160 000 dpm (**32 %**)
- dans substrat résiduel (minéralisation) 1 660 000 dpm (**7,5 %**)
- Total récupéré : **99,5 %**

N° 4 avec 32 500 000 dpm au départ. Situation à T11 (43 jours) :

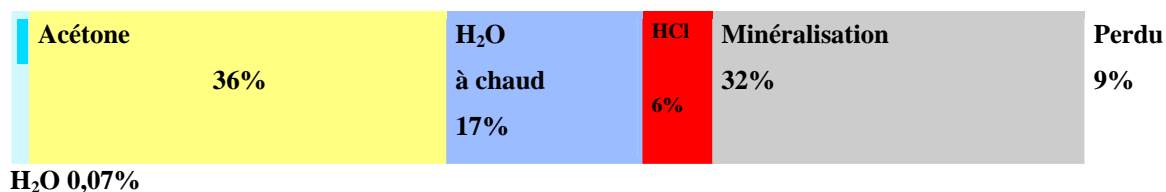
- dans l'eau 19 200 dpm (**0,05 %**)
- dans l'acétone 21 300 000 dpm (**61 %**) 17 800 000 dans EP et 3 500 000 dans H₂O/acétone
- dans eau à chaud 11 270 000 dpm (**32 %**)
- dans substrat résiduel (minéralisation) 2 120 000 dpm (**6 %**)
- Total récupéré : **99 %**

Ces résultats sont résumés dans la figure IV, 3.

N° 1



N° 2



N° 3



N° 4



Figure IV, 3 : Bilan (en % de l'aclonifen introduit) de la récupération de l'aclonifen à T₄₃ jours dans les quatre substrats étudiés (N°1 = sable, N°2 = sable + terre franche, N° 3 et N° 4 = sable + terre franche + terreau).

Le premier constat est qu'après un mois et demi de contact aclonifen-substrat le taux de récupération de la matière active est très élevé (situé entre 91 et 99% de la quantité mise au départ).

Les deux premiers substrats (100 et 50 % de sable) ont un comportement assez semblable, la partie d'aclonifen très fortement liée au substrat se situe entre 30 et 40%. Cela correspond essentiellement à ce qui est obtenu par minéralisation. Cette partie non extractible malgré des procédés puissants et quantifiée après minéralisation, semble relever de ce qu'il est convenu d'appeler des « résidus liés ». Bien que l'essentiel de l'adsorption se fasse de manière quasi instantanée, Il est surprenant de trouver une telle valeur pour du sable seul qui n'est pas décrit comme adsorbant puissant. Nous suspectons notre substrat sable d'avoir une composante minérale non siliceuse très adsorbante (nous avons vérifié que ce substrat ne contenait pas de carbone organique). Enfin, avec ces deux substrats, la partie facilement ou moyennement biodisponible pour les plantes (fraction eau + fraction acétone) est voisine de 36 à 42 %.

De manière assez surprenante, le fait de rajouter de la matière organique peu dégradée dans le substrat (expérience N°3 et N° 4 contenant 20 % de terreau) change la distribution et la biodisponibilité de l'aclonifen. La fraction eau libre est alors très peu concentrée (0,02 à 0,05 % de la quantité appliquée). Par contre, la fraction « acétone » est très majoritaire (environ 60 % de ce qui est déposé) et les « résidus » liés (taux obtenu par l'étape de minéralisation) tombent à 6-7 %. Les 60 % facilement extraits par l'acétone seraient en situation d'être assez facilement bio-disponibles par le jeu d'un déplacement dans l'équilibre de partition. Lors des différentes extractions effectuées, afin d'établir le bilan présenté, nous avons recherché la nature chimique des composés radioactifs extraits à travers l'analyse chromatographique des solutions récupérées et autoradiographie. A 43 jours dans nos conditions expérimentales avec les 4 substrats utilisés c'est l'aclonifen qui est présent et non d'éventuels métabolites issus de l'activité de la microflore. Dans nos modèles de substrats, la matière active apparaît chimiquement très stable au moins durant 1,5 mois (figure IV, 4).

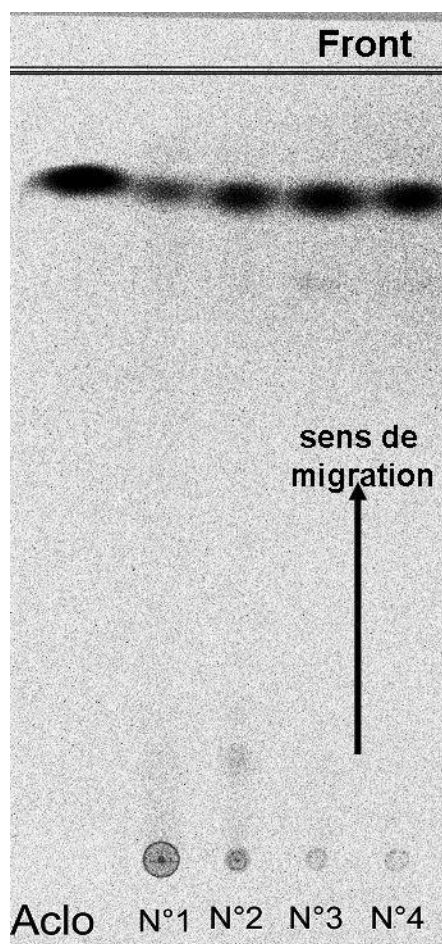


Figure IV, 4 : Autoradiographie des extraits acétoniques obtenus à T45 jours de contact entre l'eau additionnée d'aclonifen et différents substrats (N°1, N°2, N°3 et N°4) et l'eau. CCM sur silice. Support silice, solvant : EP (40-60°C) / dichloroéthane / acétate d'éthyle (10/4/3).

3) Cinétique d'adsorption sur un deuxième substrat sable propre sans trace de matière organique (dosage du taux de carbone nul).

Face aux résultats précédents obtenus avec un « sable contaminé » nous avons utilisé pour d'autres mesures de partition substrat/eau un sable de rivière pour lequel nous avons vérifié l'absence de trace d'éléments carbonés susceptibles de jouer un rôle majeur dans la liaison de l'aclonifen. Les résultats de partition obtenus sont présentés dans le tableau IV, 2 Le tableau résume les mesures effectuées sur un pas de temps de près de 3 mois (83 j).

Alors que nous attendions une adsorption nulle (partition voisine de 1) sur ce type de sable, les résultats montrent que ce substrat se comporte de manière inattendue dans son interaction avec l'aclonifen. Force est de constater qu'au cours du temps la concentration dans l'eau diminue régulièrement jusqu'au 50^{ème} jour puis se stabilise avec un facteur de partition élevé en faveur du substrat. **En fin d'expérimentation, la teneur dans l'eau ne représente plus que 5,7 % de la teneur en aclonifen appliquée dans l'eau à T0. Le pourcentage d'aclonifen retrouvé associé au substrat passe de 47% à T0 à 90% à T26 (83 jours).** Cette partition est déjà très forte à l'instant T0. En effet, en tenant compte du temps de manipulation de l'échantillon T0 (environ 1 heure), le rapport de partition est déjà d'environ 50% entre l'eau et le substrat. Il faut alors supposer que la silice du sable est en situation de retenir l'aclonifen à partir d'une présence dans l'eau ou que des structures argileuses présentes avec la silice sont capables de retenir l'herbicide entre ses feuillets. Cette deuxième hypothèse semblait pouvoir être écartée car nous avons pris la précaution de laver abondamment le substrat pour éliminer les structures les plus fines du matériau utilisé. Cette rétention sur le sable est peut être à rapprocher du comportement chromatographique de l'aclonifen sur plaque de silice avec l'eau comme solvant : $R_f = \text{zéro}$.

Tableau IV, 2 : Evolution de la teneur en aclonifen (dpm/ml, dpm/g) dans l'eau associée à un substrat sable. La cinétique porte sur une période de 83 jours.

	Jours	dpm/ml eau	dpm dans eau	dpm dans substrat (calculé)	dpm/g substrat (calculé)	Rapport de partition [substrat] / [eau]	% dans l'eau	% dans le substrat
T0	0	96400	5784000	5216000	17387	0,18	52,58	47,42
T1	2	52200	3132000	7868000	26227	0,50	28,47	71,53
T2	4	55000	3300000	7700000	25667	0,47	30,00	70,00
T3	6	47750	2865000	8135000	27117	0,57	26,05	73,95
T4	8	48280	2896800	8103200	27011	0,56	26,33	73,67
T5	10	39486	2369160	8630840	28769	0,73	21,54	78,46
T6	13	32304	1938240	9061760	30206	0,94	17,62	82,38
T7	15	33215	1992900	9007100	30024	0,90	18,12	81,88
T8	17	31353	1881180	9118820	30396	0,97	17,10	82,90
T9	21	30990	1859400	9140600	30469	0,98	16,90	83,10
T10	24	28623	1717380	9282620	30942	1,08	15,61	84,39
T11	27	24651	1479060	9520940	31736	1,29	13,45	86,55
T12	29	27312	1638720	9361280	31204	1,14	14,90	85,10
T13	31	25589	1535340	9464660	31549	1,23	13,96	86,04
T14	34	24181	1450860	9549140	31830	1,32	13,19	86,81
T15	36	21599	1295940	9704060	32347	1,50	11,78	88,22
T16	38	22402	1344120	9655880	32186	1,44	12,22	87,78
T17	41	21062	1263720	9736280	32454	1,54	11,49	88,51
T18	44	21360	1281600	9718400	32395	1,52	11,65	88,35
T19	50	19175	1150500	9849500	32832	1,71	10,46	89,54
T20	52	17698	1061880	9938120	33127	1,87	9,65	90,35
T21	55	17637	1058220	9941780	33139	1,88	9,62	90,38
T22	61	17009	1020540	9979460	33265	1,96	9,28	90,72
T23	67	17637	1058220	9941780	33139	1,88	9,62	90,38
T24	72	17582	1054920	9945080	33150	1,89	9,59	90,41
T25	78	17026	1021560	9978440	33261	1,95	9,29	90,71
T26	83	17386	1043160	9956840	33189	1,91	9,48	90,52

L'évolution du facteur de partition entre le substrat et l'eau lors de l'expérimentation de 83 jours est présentée sous forme de la figure IV, 5. Après une forte adsorption durant les 2 premières heures, une croissance régulière a lieu durant 48 h avant d'attendre un équilibre (entre 50 et 83 jours).

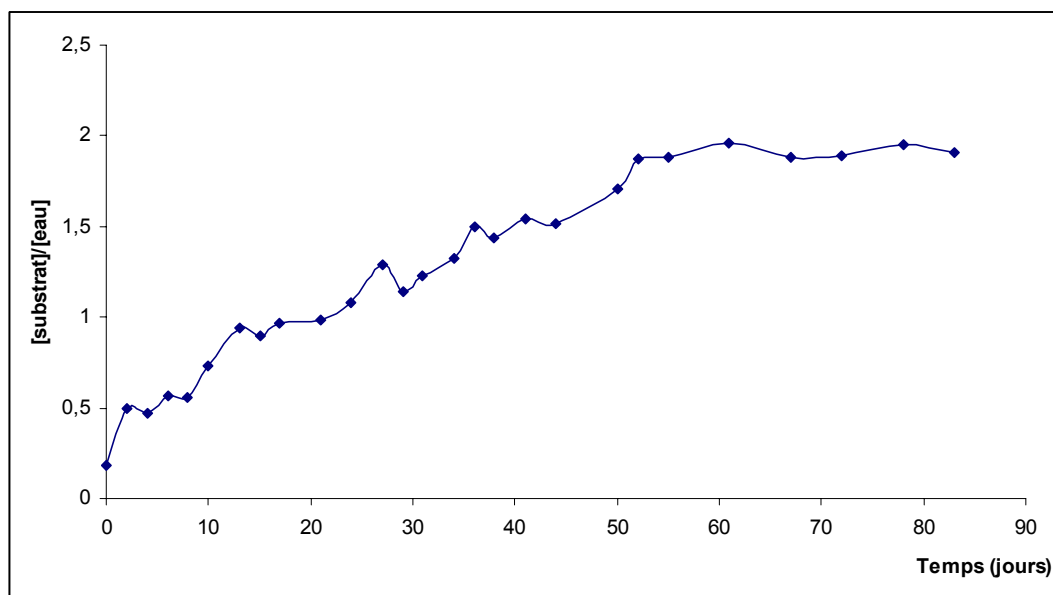


Figure IV, 5 : Evolution du rapport de partition de l'aclonifen retenu sur le substrat sable vis-à-vis de l'aclonifen retenu dans l'eau. Cette cinétique porte sur 83 jours. Les concentrations sont exprimées en μM .

A T26 (83 jours), le dispositif est vidé par aspiration prolongée de sa phase liquide et le substrat récupéré est lavé par différents solvants comme indiqué plus haut (acétone puis eau chaude sous reflux et enfin minéralisation). La première constatation concerne le bilan de radioactivité retrouvé (somme de la radioactivité retrouvée dans l'eau + la radioactivité extraite du substrat), celle-ci est supérieure à 90%. Cette radioactivité se répartie de la manière suivante (figure IV, 6).

La quantité d'aclonifen associée au substrat après 83 jours dans nos conditions expérimentales, ne répond pas de manière homogène aux différentes extractions effectuées. La plus grande quantité retenue sur le substrat est décrochée par la fraction acétonique (cette phase représente 40% de la quantité apportée en début d'expérimentation. L'aclonifen probablement adsorbée sur la surface des grains est très facilement solubilisé dans l'acétone, cela signifie que cette forte proportion de matière active récupérée dans l'acétone était très faiblement liée au substrat. La plus forte probabilité est que cette fraction aclonifen était précipitée sur le support sans autre forme de liaison avec le substrat. La fraction obtenue sous reflux dans l'eau à forte température (17% du total appliqué) correspond à une fraction plus fortement retenue sur le substrat. Les éléments chimiques de la composition du sable utilisé manquent pour donner une explication argumentée de cet état de fait. La somme de ce qui reste dans le substrat traité par l'acétone et le reflux se compose de ce qui est retrouvé par minéralisation et ce qui est compté dans le culot ultime. Cela représente près du 1/4 de la

quantité apportée (24%). Avec comme substrat un vrai sol agricole, un tel pourcentage serait immédiatement interprété comme étant associé aux humus comme résidus liés, c'est-à-dire inextractibles. En absence de matière organique dans notre substrat on ne peut que supposer la présence dans notre substrat « sable » de structures de type argiles en situation de lier chimiquement l'aclonifen.

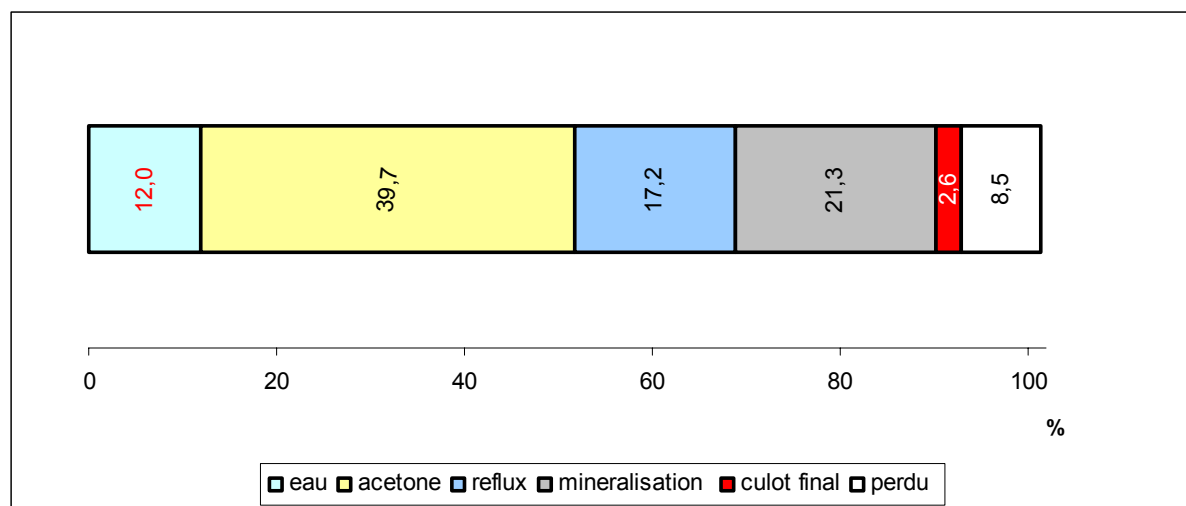


Figure IV, 6 : Pourcentages de répartition de l'aclonifen entre la phase aqueuse et le substrat sable en fin d'expérimentation de partition (après 83 jours). Le % eau (12%) correspond à ce qui est solubilisé dans l'eau du partage, ce qui est associé au substrat correspond au reste. 8,5% de la radioactivité mise à T0 ne sont pas retrouvés, ce qui est peu compte tenu de la longueur de l'expérience et du nombre de manipulations effectuées en 83 jours.

Sur une telle période d'expérimentation (près de 3 mois) nous étions en droit de nous poser la question de la stabilité de la molécule d'aclonifen dans notre système malgré la présence d'un substrat peu approprié au développement d'une microflore bactérienne dans notre dispositif expérimental. Lors des extractions réalisées à 83 jours nous avons déposé sur plaque chromatographique (SiO₂) une partie partie aliquote de chacune des fractions récoltées et développé le chromatogramme. Seul l'aclonifen est détecté dans nos différents extraits.

Ainsi, ce qui devait être un substrat neutre vis-à-vis de l'aclonifen dans les mesures de partage de la matière active entre l'eau est le substrat se révèle être dans les deux types de sables utilisés un substrat capable d'adsorber entre 5% (sable 1 à 43j) et 25% (sable 2 à 83j) de la quantité de matière active apportée en début d'expérimentation.

II) Partition de l'aclonifen entre l'eau et des argiles et l'eau et l'acide humique.

Parmi les substances capables d'adsorber fortement les pesticides dans les sols se trouve en premier lieu l'humus vrai sous forme d'acides fulviques, d'acides humiques et de l'humine (de fortes capacités d'adsorption sont reconnues pour ces matrices vis-à-vis de nombreux

pesticides lipophiles). A un niveau moindre, il a été démontré que certaines argiles (origine minérale) pouvaient aussi jouer un rôle dans l'adsorption des pesticides par les sols. Ces argiles constituées de feuillets peuvent piéger dans leurs structures des matières actives apportées par l'eau du sol.

A) Matériel et méthodes.

1) Données expérimentales.

Nous avons recherché la partition de l'aclonifen sur des structures organiques et argileuses commerciales. Pour ce faire nous avons utilisé un substrat organique : l'acide humique (forme acide, Sigma) et deux argiles différentes : le kaolin (2 feuillets) et la montmorillonite (3 feuillets). Les argiles sont commercialisées pour le kaolin par Sigma-Aldrich Chemie GmbH (K7375), pour la montmorillonite K10 par Fluka Chemika (surface $200 \pm 20 \text{ m}^2/\text{g}$ densité $300 \pm 30 \text{ g/l}$), pour l'acide humique par Fluka Chemika

Les conditions à T0 ont les suivantes : acide humique 5 g avec 25 ml d'eau et 950 000 dpm (37500 dpm d'aclonifen /ml). Kaolin et montmorillonite 10 g et 50 ml d'eau avec 1 900 000 dpm (37500 dpm/ml). Aux doses appliquées, l'aclonifen est encore totalement soluble dans l'eau. Les expérimentations sont réalisées en triplicats. Les échantillons ainsi préparés sont placés sur une plaque d'agitation (150 rpm), à l'obscurité.

L'expérimentation est conduite sur 72 h. Pour suivre le niveau de partition entre la phase aqueuse et le substrat, des prélèvements de mélange sous agitation sont réalisés à T0, T2h, T6h, T48h et T72h.

Chaque prélèvement de 2 ml de suspension est réalisé sans arrêter la table oscillante. Le contenu du prélèvement est centrifugé 10 min. à 5000 rpm. Un ml de surnageant est prélevé pour comptage de radioactivité. L'excès de surnageant est éliminé, le culot est pesé puis minéralisé. Ces deux comptages nous permettent d'établir le rapport de partition entre le substrat et l'eau.

Après le dernier prélèvement servant à établir les cinétiques de partition, nous avons utilisé les échantillons restants pour faire un bilan de radioactivité dans nos trois types d'échantillons.

C) Résultats

1) Cinétiques de partition de l'aclonifen entre l'eau, l'acide humique, la montmorillonite et le kaolin (figures IV, 7, 8 et 9)

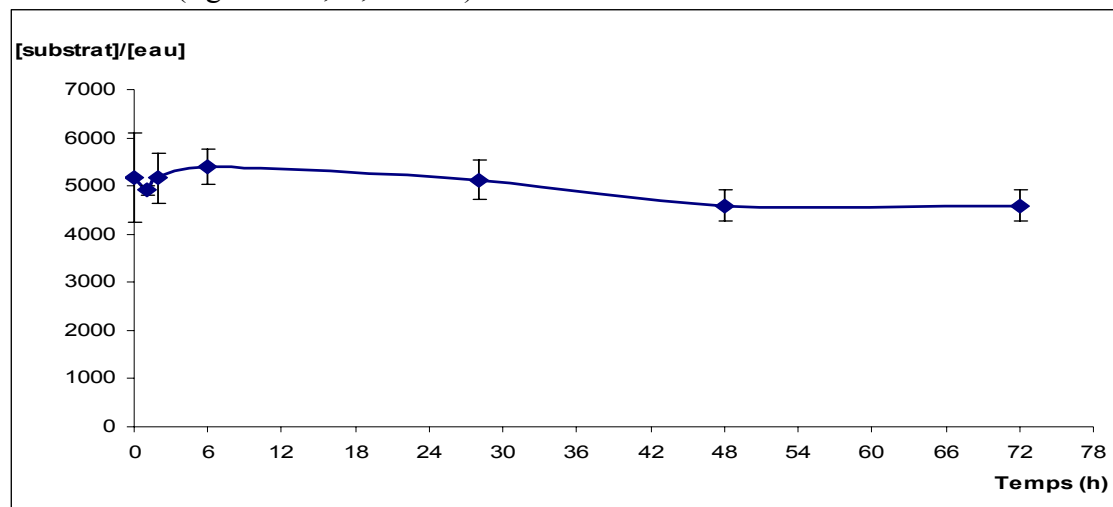


Figure IV, 7 : Evolution du facteur de partition de l'aclonifen entre un substrat formé d'acide humique (Sigma) et l'eau. L'expérience se déroule sur 72 h avec 7 prélèvements effectués. Les barres statistiques portent sur trois réplicats

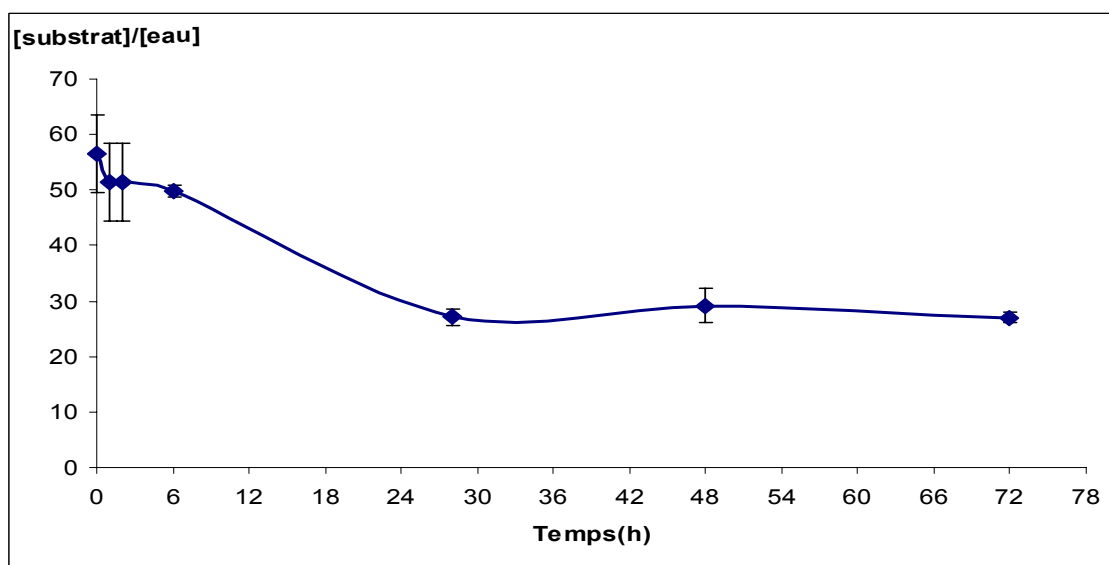


Figure IV, 8 : Evolution du facteur de partition de l'aclonifen entre un substrat formé de montmorillonite et l'eau. L'expérience se déroule sur 72 h avec 7 prélèvements effectués. Les barres statistiques portent sur trois réplicats.

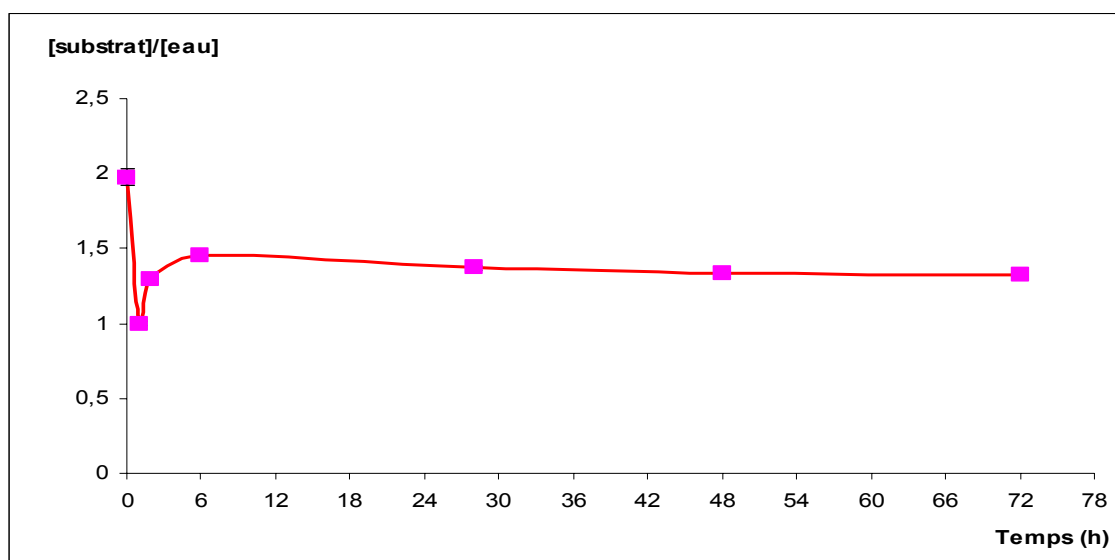


Figure IV, 9 : Evolution du facteur de partition de l'aclonifen entre un substrat formé de kaolin et l'eau. L'expérience se déroule sur 72 h avec 7 prélèvements effectués. Les barres statistiques portent sur trois réplicats.

Les trois figures présentées montrent toutes les trois qu'il s'établit un équilibre de partition entre les trois matrices choisies et l'eau contenant l'aclonifen. Avec deux substrats (kaolin et acide humique) cet équilibre de partition est rapidement atteint (moins de 6 h) et reste largement stable par la suite. Avec la montmorillonite l'équilibre de partition est plus tardif (une trentaine d'heure) et peut être mis en relation avec la structure à 3 feuillets de ce type d'argile.

Une autre remarque peut être faite : la très grande variation de l'équilibre de partition en fonction du substrat. Avec l'acide humique utilisé comme substrat, nos résultats montrent une partition de 5000, soit 5000 molécules sur ou dans le substrat pour 1 dans l'eau (log de partition = 3,70). Avec les argiles utilisées ce facteur de partition chute à 30 pour la montmorillonite (log de partition = 1,48), et atteint péniblement 1,5 avec le kaolin.

Ainsi, la matière organique des sols durant ses phases de transformation en humus vrai (ac. fulviques, ac. humiques, humine) est-elle en situation de très forte adsorption de l'aclonifen. Les argiles sont nettement moins absorbantes mais cependant certaines sont porteuses de propriétés de rétention de l'aclonifen non nulles. C'est le cas de la montmorillonite, 100 fois moins absorbante que l'acide humique mais susceptible de jouer un rôle dans le sol.

2) Etude de l'équilibre eau/substrats/aclonifen à 72h avec l'acide humique, la montmorillonite et le kaolin :

Dans chaque flacon en fin d'expérimentation, nous avons prélevé 5 ml de suspension soit 0,83 g de substrat sec et 4,2 ml de solution radioactive. L'eau du surnageant est comptée directement. Par contre, le substrat est épuisé par 5 extractions à l'éthanol (pour déterminer la

part extractible du substrat). Le substrat ainsi traité est ensuite minéralisé pour déterminer la part « résidus liés » inextractibles par les solvants et donc irrémédiablement non biodisponible.

2a) Cas du kaolin :

Les résultats concernant l'essai kaolin à 72h sont présentés tableau IV, 3 et figure IV, 10.

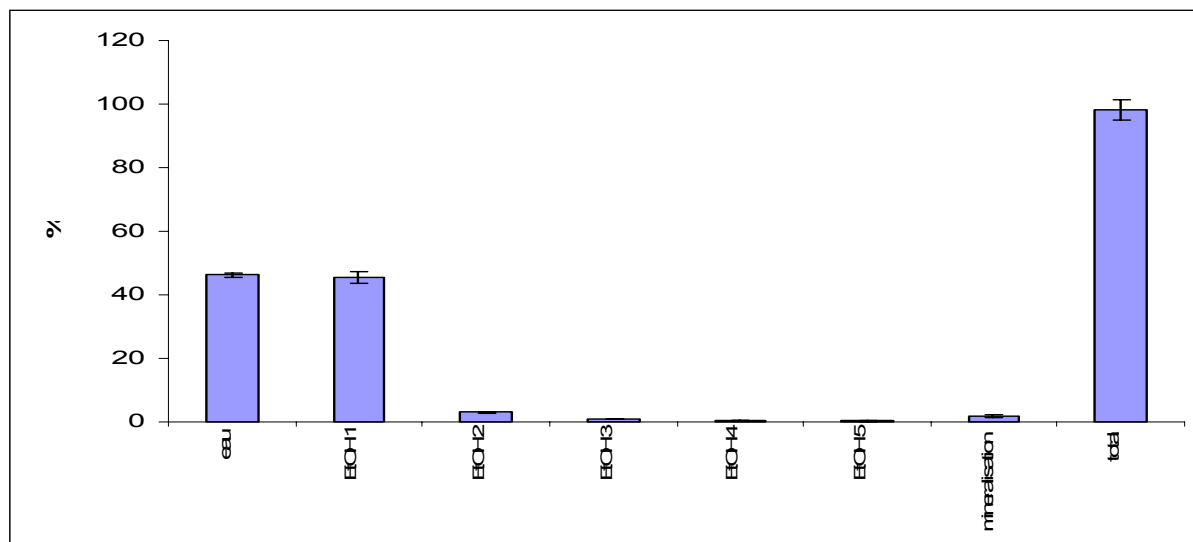


Figure IV, 10 : Répartition de la radioactivité entre le substrat kaolin et l'eau après 72 de partage entre ces deux phases. La radioactivité liée à la présence d'aclonifen et associée à la matrice solide correspond aux 5 fractions éthanol et à la minéralisation. Les valeurs exprimées représentent les % d'aclonifen retrouvé dans chaque phase d'extraction. 3 réplicats.

Tableau IV, 3 : Radioactivité (exprimée en dpm) retrouvée dans l'eau du partage et extrait du substrat kaolin après 72h d'agitation. Le substrat a été extrait 5 fois à l'éthanol puis minéralisé. Le tableau présente les % de chaque extrait. Les valeurs sont une moyenne de trois réplicats.

	eau	EtOH 1	EtOH 2	EtOH 3	EtOH 4	EtOH 5	minéralisation	Total
dpm	73984± 1026	72823± 2907	4897± 358	1701± 109	583± 72	391± 46	2860± 454	157242± 4975
%	47,1± 0,65	46,4± 1,85	3,1± 0,23	1,1± 0,07	0,4± 0,05	0,3± 0,03	1,8± 0,29	100± 3,17

47% de la radioactivité se retrouve dans l'eau et 53 % sont associés au kaolin, soit une partition d'environ 50/50. Cela signifie que le kaolin n'est pas un fort adsorbant de l'aclonifen. La partie associée au kaolin n'est pas fortement liée car 46% de la radioactivité introduite dans l'expérimentation sont présents dans le 1er extrait éthanol. Les autres extraits éthanoliques sont faiblement concentrés (entre 0,25 et 3% du total appliqué). La quantité d'aclonifen quantifiée par minéralisation correspond à 1,8%, c'est à ne dire pratiquement rien. Cela signifie qu'il n'y a pas de « résidus liés » avec le kaolin. Sur l'ensemble de

l'expérience le taux de récupération est de 100% de l'aclonifen apporté en début d'expérience.

2b) Cas de la montmorillonite :

Les résultats d'équilibre obtenus avec la montmorillonite à 72h sont présentés au tableau IV, 4 et à la figure IV, 11.

Avec cette argile, la situation d'équilibre varie très fortement de celle enregistrée avec le kaolin. Seulement 3% de la radioactivité mise au départ se retrouve dans l'eau (contre près de 50% avec le kaolin. Les deux premiers rinçages du substrat avec de l'éthanol récupèrent près de 85 % de la quantité d'herbicide recherchée. Cet état de fait tend à démontrer que l'aclonifen associé à la montmorillonite se fait par des liaisons faibles (eau piégée entre les feuillets d'argile, précipitation à la surface du substrat). Par minéralisation, seul 3% sont récupérés. C'est la part d'aclonifen fortement retenue sur le substrat après 72h. Elle peut être considérée comme une fraction « résidus liés », cette part est faible et dans notre expérimentation aurait peut être pu être récupérée sous reflux. Le taux de récupération de l'aclonifen introduit dans le système est de 98%.

Tableau IV, 4 : Valeur de radioactivité (exprimée en dpm) retrouvée dans l'eau du partage et extrait du substrat montmorillonite après 72h d'agitation. Le substrat a été extrait 6 fois à l'éthanol puis minéralisé. Le tableau présente les % de chaque extrait. Les valeurs sont une moyenne de trois réplicats.

	eau	EtOH 1	EtOH 2	EtOH 3	EtOH 4	EtOH 5	EtOH 6	minéralisation	total
dpm	5657± 183	122990± 8180	21235± 2128	8734± 1081	1768± 232	463± 10	391± 46	5460± 572	166698± 11386
%	3,33± 0,1	72,35± 4,8	12,49± 1,3	5,14± 0,6	1,04± 0,1	0,27± 0,1	0,23± 0,1	3,21± 0,3	98,06± 6,7

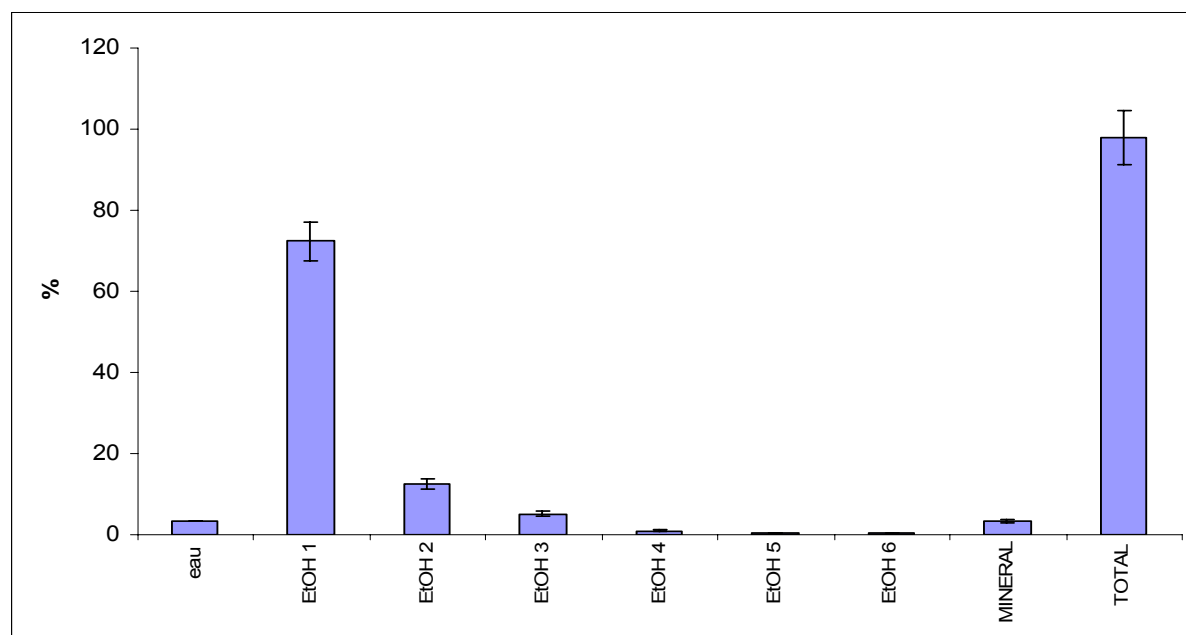


Figure IV, 11 : Répartition de la radioactivité entre le substrat montmorillonite et l'eau après 72 de partage entre ces deux phases. La radioactivité liée à la présence d'aclonifen et associée à la matrice solide correspond aux 6 fractions éthanol et à la minéralisation. Les valeurs exprimées représentent les % d'aclonifen retrouvée dans chaque phase d'extraction. 3 réplicats.

2c) Cas de l'acide humique :

Avec l'acide humique comme substrat la situation est très différente de celle observée avec les deux argiles utilisées précédemment. Les résultats sont résumés dans le tableau IV, 5 et la figure IV, 12.

Tableau IV, 5 : Valeur de radioactivité (exprimée en dpm) retrouvée dans l'eau du partage et extrait du substrat acide humique après 72h d'agitation. Le substrat a été extrait 6 fois à l'éthanol puis minéralisé. Le tableau présente les % de chaque extrait. Les valeurs sont une moyenne de trois réplicats.

	eau	EtOH 1	EtOH 2	EtOH 3	EtOH 4	EtOH 5	EtOH 6	minéralisation	total
dpm	10± 2,00	6645± 836	6433± 1423	34852± 1327	5671± 365	1944± 241	1305± 154	68355± 5335	125207± 9685
%	0,008± 0,0002	4,25± 0,5	4,11± 0,9	22,29± 0,9	3,63± 0,2	1,24± 0,2	0,83± 0,1	43,71± 3,4	80,07± 6,2

Le taux de récupération de la radioactivité apportée en début d'expérimentation n'est cette fois ci que de 80%, ce qui laisse envisager des liaisons entre l'aclonifen et le substrat organique de nature différentes de celles créées avec les argiles (difficultés d'extraction, perte de disponibilité). Le fait d'une adsorption forte sur la matrice se traduit naturellement par une présence de l'herbicide dans l'eau très faible à la limite de la détection par scintillation liquide. L'extraction par l'éthanol n'est pas immédiate (le 3^{ème} extrait apparaît comme étant le plus chargé : 22% de la radioactivité apportée, comparé aux extraits 1 et 2 chacun à 4 %). Ce

qui laisse supposer que l'aclonifen est alors associé à une phase très lipophile, les deux premières extractions par EtOH ayant servi alors à déshydrater le matériel. Les trois réplicats se comportent de la même manière.

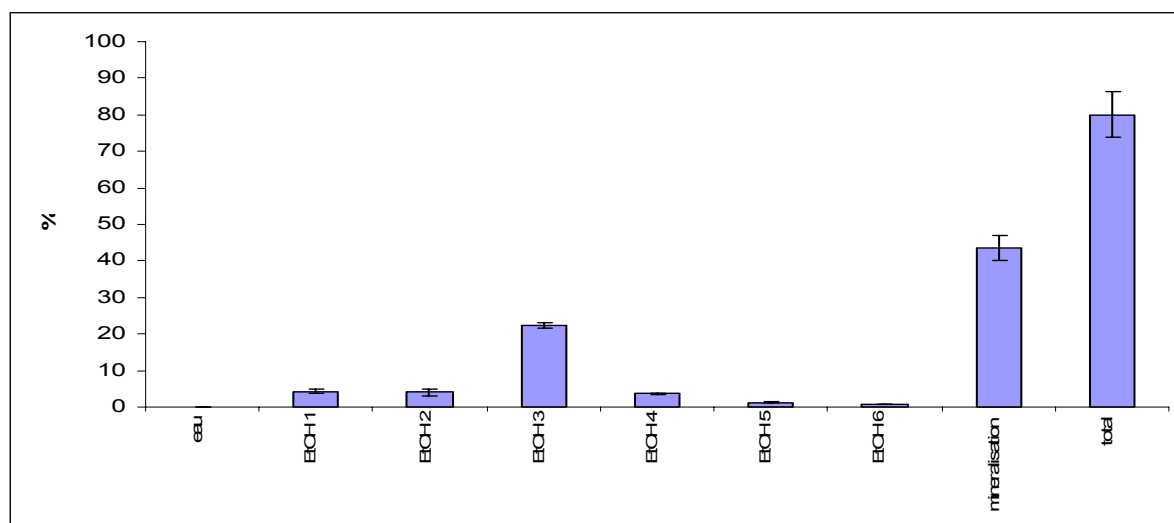


Figure IV, 12 : Répartition de la radioactivité entre le substrat acide humique et l'eau après 72 de partage entre ces deux phases. La radioactivité liée à la présence d'aclonifen et associée à la matrice solide correspond aux 6 fractions éthanol et à la minéralisation. Les valeurs exprimées représentent les % d'aclonifen retrouvés dans chaque phase d'extraction. Moyenne de 3 réplicats.

Ces résultats différents de ceux obtenus avec les argiles montrent que les liaisons au substrat ne sont pas de la simple adsorption/précipitation en surface mais que des liaisons fortes s'installent dans le temps entre l'aclonifen et la matière organique. Un minimum de 43% de la quantité apportée en début d'expérimentation se retrouve dans le dosage « minéralisation », cette fraction correspond à la part des « résidus liés », inextractibles par les solvants. Il est possible que pour les 3 réplicats nos conditions expérimentales de minéralisation n'aient pas été suffisantes et que les 20% qui manquent dans le bilan soient la part restée adsorbée sur le substrat non minéralisé.

III) Vers un réalisme agronomique : évolution sur 120 jours de la teneur en aclonifen dans l'eau et le substrat lors d'un traitement à la dose agronomique.

A) Matériel et méthodes

L'expérimentation se déroule dans notre serre avec un mélange terre/terreau/sable (1/1/1 : v/v/v). Le mélange est contenu dans des pots en plastique noir de 20 l. de volume. La couche de sol de surface (1 cm) est préparée avec attention pour effectuer le traitement. Le mélange qui va constituer la couche traitée de surface est tamisé à 2 mm et homogénéisé le plus finement possible. Le substrat tamisé (764 g de masse sèche par pot correspondra à la couche supérieure de 1 cm d'épaisseur) est contaminé de la manière suivante par l'aclonifen formulé (Challenge 600 équivalent à 20 mg de matière active) en solution dans l'acétone (400 ml)

additionné d'aclonifen radioactif 10 000 000 dpm soit 125 nmoles d'aclonifen marqué. Cela correspond à la dose agronomique. Cette solution acétonique est mélangée avec le substrat tamisé, le mélange est homogénéisé, laissé 24 h sous hotte aspirante pour évaporation naturelle de l'acétone. Le mélange ainsi traité et débarrassé du solvant est déposé à la surface des pots préalablement pré-remplis jusqu'à 1 cm de la surface, la quantité de ce mélange traité (764 g/pot) correspond à une couche fine de substrat mimant une surface de sol traité à la dose (homogène) agronomique. La dose de radioactivité appliquée correspond à 14150 dpm/cm² (surface du pot 706 cm² pour un apport total de radioactivité de 10 000 000 dpm). Les pots en expérimentation sont maintenus humides par arrosage modéré tous les 3 jours.

A intervalles de temps réguliers nous avons effectué des prélèvements de substrat par carottage à l'aide d'un emporte-pièce métallique (longueur 10 cm et surface de 4,15 cm²). Ces carottes sont délicatement sorties de l'emporte-pièce par pression, déposées et emballées dans un film plastique, observées au Phosphorimageur pour localiser dans la colonne de terre la position de la radioactivité. Lorsque les résultats de position de la radioactivité sont obtenus, les carottes sont découpées en tranches (partie supérieure de 1 cm d'épaisseur, partie médiane de 3 cm et partie du bas correspondant au reste de la carotte, en général 3 cm du fait du tassement de la colonne de terre lors du carottage). Chaque partie ainsi identifiée et isolée sera traitée par différents solvants afin de localiser et de quantifier la matière active appliquée. Du point de vue de la radioactivité nous recherchons le devenir des 60000 dpm appliqués sur une surface de 4,15 cm² correspondant à la surface de l'emporte-pièce.

Le protocole d'extraction de la radioactivité a été le suivant pour chaque échantillon de substrat : un g de substrat est extrait par 2 fois 10 ml d'eau (« eau 1 et eau 2 »), le substrat ainsi traité est alors extrait par 2 fois 10 ml d'éthanol (« EtOH 1 et EtOH 2 »). Le substrat récupéré est ensuite extrait sous reflux à l'eau chaude (10ml à 90°C, 1 h). Le substrat restant est alors minéralisé avec 10 ml d'un mélange (H₂O₂, eau, acide perchlorique : 1/1/1 : v/v/v). Tous ces extraits sont comptés par scintillation liquide.

B) Résultats.

1) Taux de récupération de l'aclonifen à T0.

En marge de l'expérimentation dont on vient de décrire le protocole, nous avons cherché à récupérer au temps T₀ et T_{48h} la radioactivité incorporée à la couche fine de sol de surface (pour juger de l'homogénéité de notre mélange et quantifier l'éventuelle adsorption précoce).

Un premier dosage T₀, a été effectué juste après le traitement du substrat débarrassé de son solvant acétonique (4 échantillons de 1 g de substrat traité ont été analysés). Les résultats sont reportés dans la figure IV, 13 et le tableau IV, 6

Figure IV, 13 : Récupération de la radioactivité par différents solvants à partir d'un g de substrat traité par une solution acétonique d'aclonifen. Quatre échantillons de 1 g ont été analysés. Les résultats sont exprimés en dpm/g de sol.

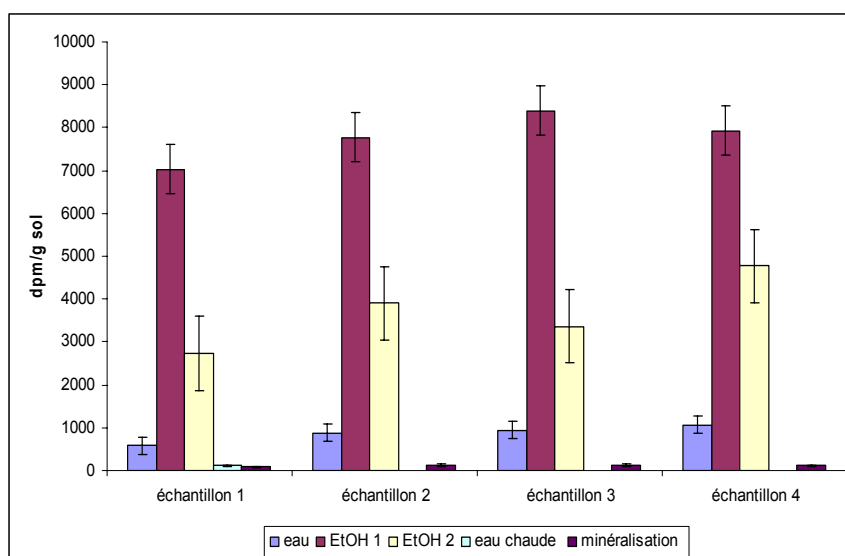


Tableau IV, 6 : Répartition de l'aclonifen extrait par différents solvants à partir d'un gramme de mélange préparé pour faire une couche de surface de sol traité à la dose agronomique. Quantité initiale 12600 dpm/g de sol. (4 réplicats nommés 1 à 4).

échantillon	eau	EtOH 1	EtOH 2	eau chaude	minéralisation	total
1	588	7021	2734	100	81	10526
2	882	7772	3899	122	121	12799
3	935	8399	3363	137	127	12964
4	1063	7925	4772	93	112	13966
moyenne	867±201	7779±571	3692±862	113±20	110±20	12564±1453

La récupération de l'aclonifen à T0 à partir d'un g de substrat préparé avec une solution acétonique d'aclonifen est pratiquement totale (moyenne de 12564 dpm/g x 764 g formant l'ensemble de la couche supérieure d'un pot de culture = 9 600 000 dpm retrouvées sur les 10 000 000 dpm théoriquement appliquées).

La deuxième observation concerne l'efficacité très forte des extractions à l'éthanol ce qui indique qu'à T0 la disponibilité de l'aclonifen est très importante, les interactions fortes de la matière active avec les éléments du substrat (humus et argiles en particulier) sont encore largement inexistantes. Les extractions par l'eau chaude sous reflux et par minéralisation (1 à 2 % pour l'ensemble) ne représentent pas grand-chose. On peut supposer que ce qui est solubilisé dans l'éthanol provient de la part de matière active adsorbée en surface du substrat.

La troisième remarque qui peut être faite à la vue de ces résultats (en particulier ceux qui correspondent à l'extrait H₂O), concerne la concentration obtenue dans l'eau du sol à l'instant T0. L'application agronomique globale en herbicide est de 20 mg par pot et la radioactivité apportée est de 10 000 000 dpm. La moyenne des dpm retrouvées dans l'eau est voisine de 1000 dpm (tableau IV, 6) ce qui correspond à une concentration dans l'eau de surface retenue

dans la couche traitée de l'ordre de 7,5 μM . C'est cette concentration qui par systémie xylémienne, doit assurer la concentration critique à l'intérieur du végétal traité. Nous avons déjà signalé qu'en cas de traitement herbicide de pré-levée, si une concentration critique n'est pas atteinte dans le sol et en particulier dans l'eau du sol, la plante traitée échappera au traitement.

2) Equilibre de partition obtenu après 48 h de contact entre l'eau (capacité au champ) et le substrat.

Afin de suivre l'adsorption de la matière active sur le substrat nous avons comparé deux situations rapprochées dans le temps (T0 et T48h) de la répartition de l'aclonifen entre eau et substrat en essayant de mimer une situation de terrain après traitement et arrivée d'une petite pluie. Cette pluie est représentée par un apport d'eau minimal (1 g de substrat + 1 ml appelé « eau 1 ») sur du substrat traité. Une fraction d'« eau 1 » est récupérée après les deux temps de contact (T0 et T 48h) par centrifugation (5000 rpm, 10 min). Le surnageant de la phase aqueuse (400 μl) est récupéré à la seringue et compté par scintillation. Pour la suite des extractions de plus en plus drastiques le rapport solvant/substrat est de 10 ml pour 1 g de substrat. Les résultats obtenus à T0 et T 48 h sont présentés figure IV, 14.

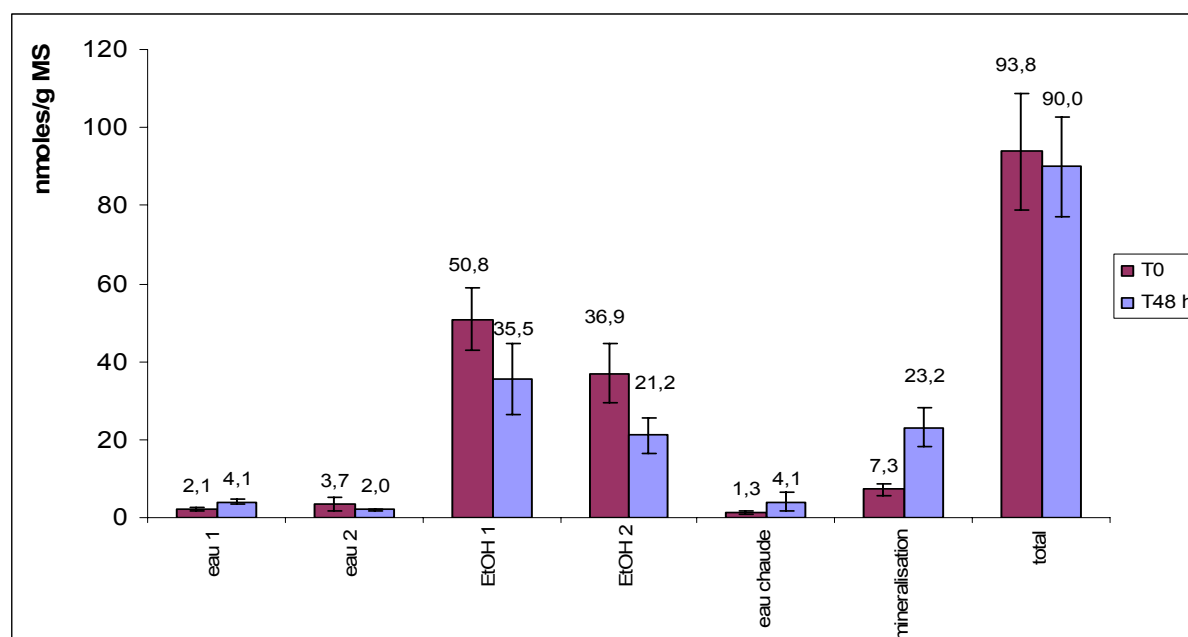


Figure IV, 14 : Comparaison de la disponibilité de l'aclonifen présent de manière homogène dans un g de sol mesurée à T0 et T 48h. Les extractions successives ont été effectuées 2 fois à l'eau, 2 fois à l'éthanol, 1 fois à l'eau sous reflux. Les résultats « eau 1 » correspondent à des concentrations en aclonifen dans l'eau d'un sol à la capacité au champ. Cette concentration mime une situation de plein champ avec traitement à la dose agronomique.

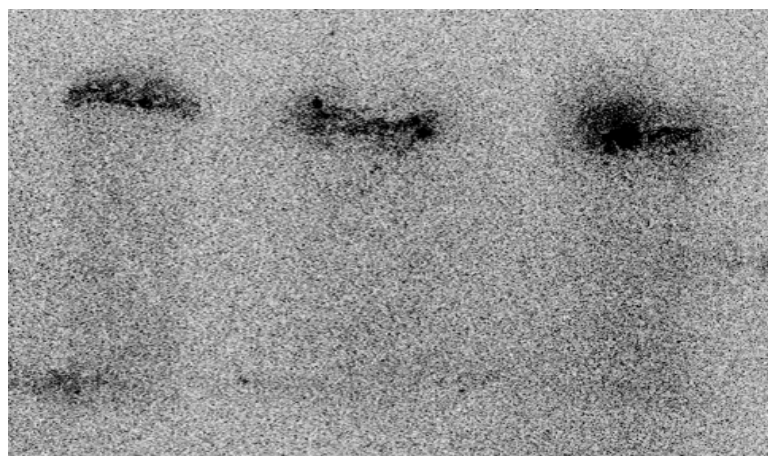
Si l'on considère les quantités totales récupérées à partir d'un g de sol traité (total extrait par l'eau puis l'éthanol et enfin par l'eau à chaud), on s'aperçoit que, en 48 h de contact

sol/eau/aclonifen, environ le quart de la matière active est déjà difficilement disponible pour les plantes (aclonifen dont la radioactivité n'est retrouvée qu'avec le traitement sous reflux et surtout par minéralisation). Dans pratiquement toutes les étapes d'extraction la situation à 48h montre un déficit par rapport au temps T0. Cela indique un chargement progressif mais rapide du complexe argilo-humique celui-ci devenant une réserve difficilement disponible en aclonifen pour l'eau du sol. La teneur dans l'eau du sol évaluée à travers la première extraction à l'eau est estimée à quelques μM (entre 2 et 4 μM) dans une eau représentant la capacité au champ au moment du traitement. Ces valeurs sont relativement proches de la valeur (7,5 μM) estimée au paragraphe précédent. Elle nous donne une estimation de la concentration dans l'eau du sol nécessaire pour entraîner une concentration phytotoxique interne à la plante traitée.

3) Distribution au cours du temps de l'aclonifen dans les tranches de « carotte » de sol ayant subi un traitement de surface.

Les « carottes » de terre prélevées à T0, T30, T60, T90 et T120 jours. Celles-ci sont en premier lieu entourées d'un film plastique et une autoradiographie est réalisée grâce au Phosphorimager (figure IV, 15).

Figure IV, 15 :
Autoradiographie de 3
« carottes » identiques issues
d'un prélèvement à T30
jours.



L'autoradiographie réalisée à T 120 jours (figure IV, 16) montre une trace en tête de colonne moins marquée qu'aux temps T15 et T30. Ceci peut être dû à une décroissance en radioactivité par métabolisation de l'aclonifen et transformation en CO_2 . Une autre possibilité de différence d'intensité entre T0 et T120 jours existe : le positionnement de la carotte sur le film d'impression de la marque radioactive. Pour suivre le devenir de l'aclonifen (position dans la colonne de sol et transformation éventuelle) nous avons décidé d'extraire le sol tranche par tranche (tranches de 1, 3 et 3 cm depuis la surface) à l'eau (2 fois 10 ml), puis à l'éthanol (2 fois 10 ml), reflux à l'eau (1 fois 10 ml d'eau), suivi d'une minéralisation. Les résultats date par date et tranche par tranche sont présentés figure IV, 17.

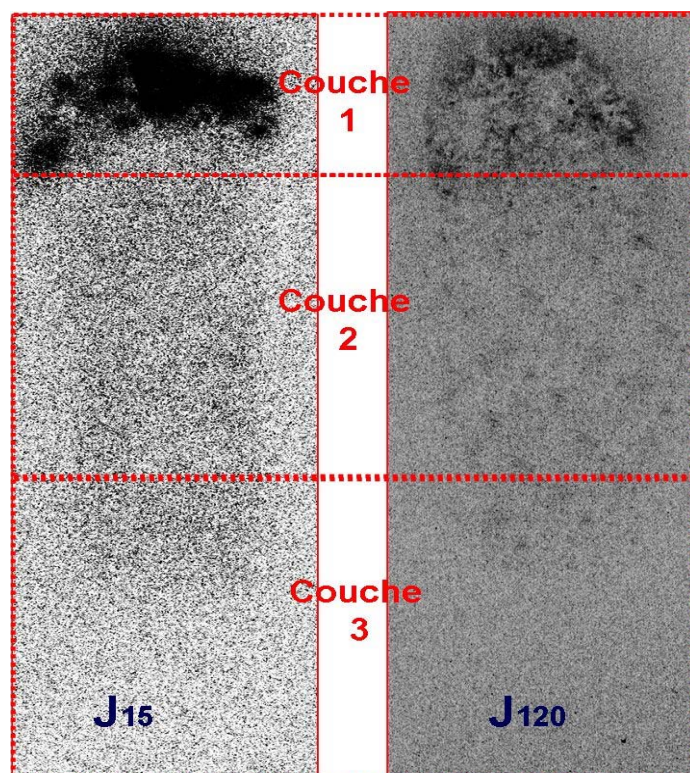


Figure IV, 16 : Autoradiographie d'une «carotte» de sol prélevée à T 120j. Exposition 48h.

A T0 toute la radioactivité introduite dans le système est retrouvée dans la couche du haut de colonne, 85% sont retrouvés dans l'eau et l'éthanol ce qui signifie que cet aclonifen est à ce moment assez largement

biodisponible. En ce début d'expérimentation (T0 = environ une heure nécessaire pour la manipulation), déjà 15% de la matière active sont adsorbés de manière forte au complexe argilo-humique (somme du reflux + minéralisation). Les couches médianes et basales de la carotte ne sont pas contaminées.

A T30 jours nous avons une perte de 5% de radioactivité, 85% de ce qui a été apporté se retrouve dans la 1ère couche et 10% dans la couche intermédiaire. La 3ème couche n'est pas contaminée. Au niveau de ce qui est retenu par la 1ère couche 25% sont fortement adsorbés au substrat.

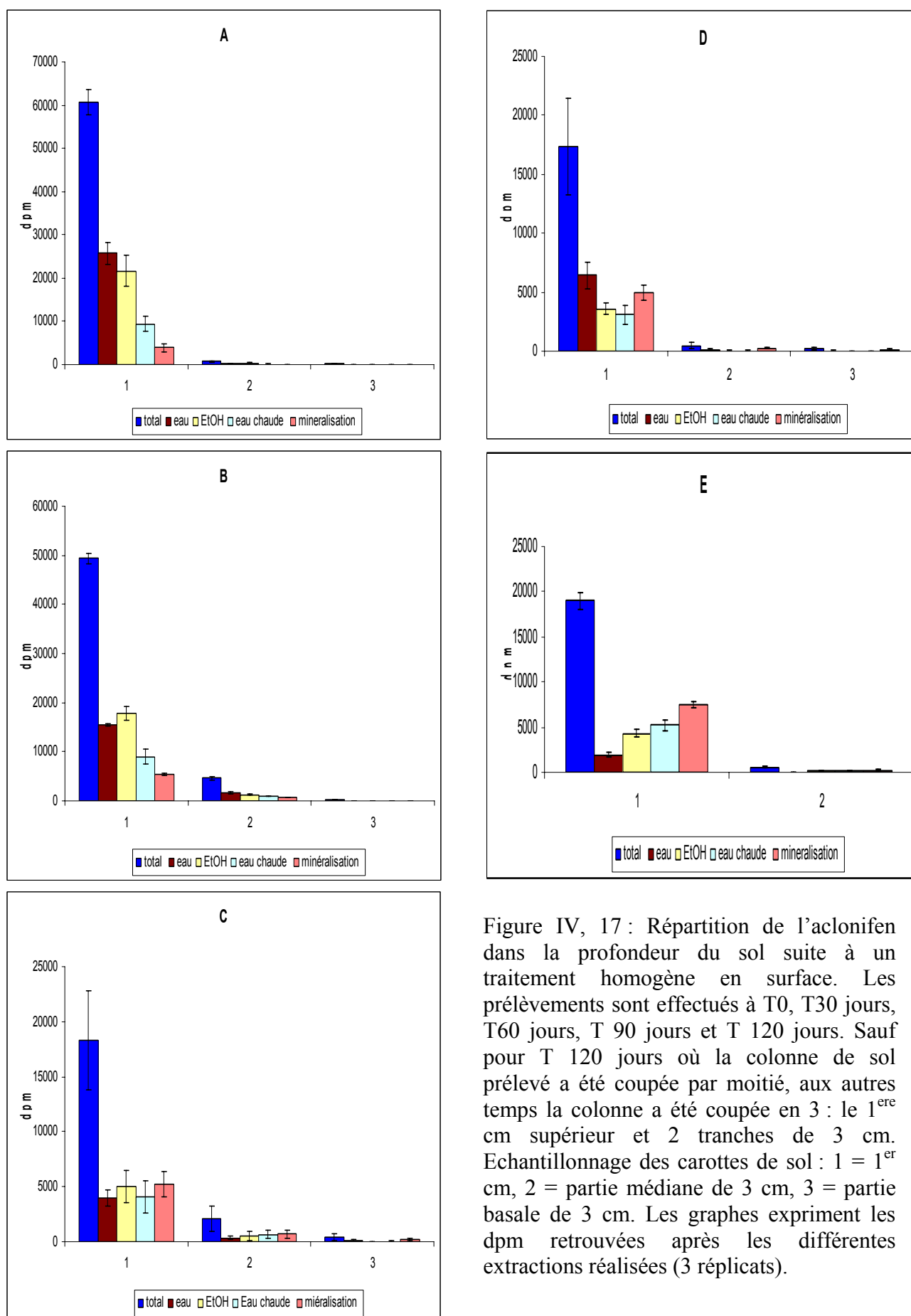


Figure IV, 17 : Répartition de l'aclonifen dans la profondeur du sol suite à un traitement homogène en surface. Les prélèvements sont effectués à T0, T30 jours, T60 jours, T 90 jours et T 120 jours. Sauf pour T 120 jours où la colonne de sol prélevé a été coupée par moitié, aux autres temps la colonne a été coupée en 3 : le 1^{er} cm supérieur et 2 tranches de 3 cm. Echantillonnage des carottes de sol : 1 = 1^{er} cm, 2 = partie médiane de 3 cm, 3 = partie basale de 3 cm. Les graphes expriment les dpm retrouvées après les différentes extractions réalisées (3 réplicats).

A partir du 60ème jour le bilan de la radioactivité retrouvé par carotte de sol devient mauvais. En effet la somme de ce qui est extrait des différentes parties ne représente plus que 50% de l'apport. Ce qui est retrouvé l'est essentiellement dans la 1ère couche (30% de l'apport) avec une moitié encore très biodisponible (extraits eau + éthanol) et une moitié fortement adsorbée sur le substrat. La couche basale n'est pratiquement pas atteinte par des quantités détectables d'aclonifen ou ses métabolites. Dans la couche intermédiaire plus de la moitié du traitement reçu par cette couche est fortement associé au substrat.

Entre 60 et 90 jours la situation évolue peu, les pertes de matière active par rapport aux quantités introduites à T0 sont voisines de 60%. Dans la couche supérieure la répartition entre ce qui est biodisponible (extraits eau + éthanol) et ce qui est très retenu est de 50% environ.

Pour exploiter les résultats à T 120 jours nous avons réalisé deux échantillons et non trois. Toute la radioactivité se retrouve dans le sommet du prélèvement avec une très large part associée au complexe argilo-humique (75%).

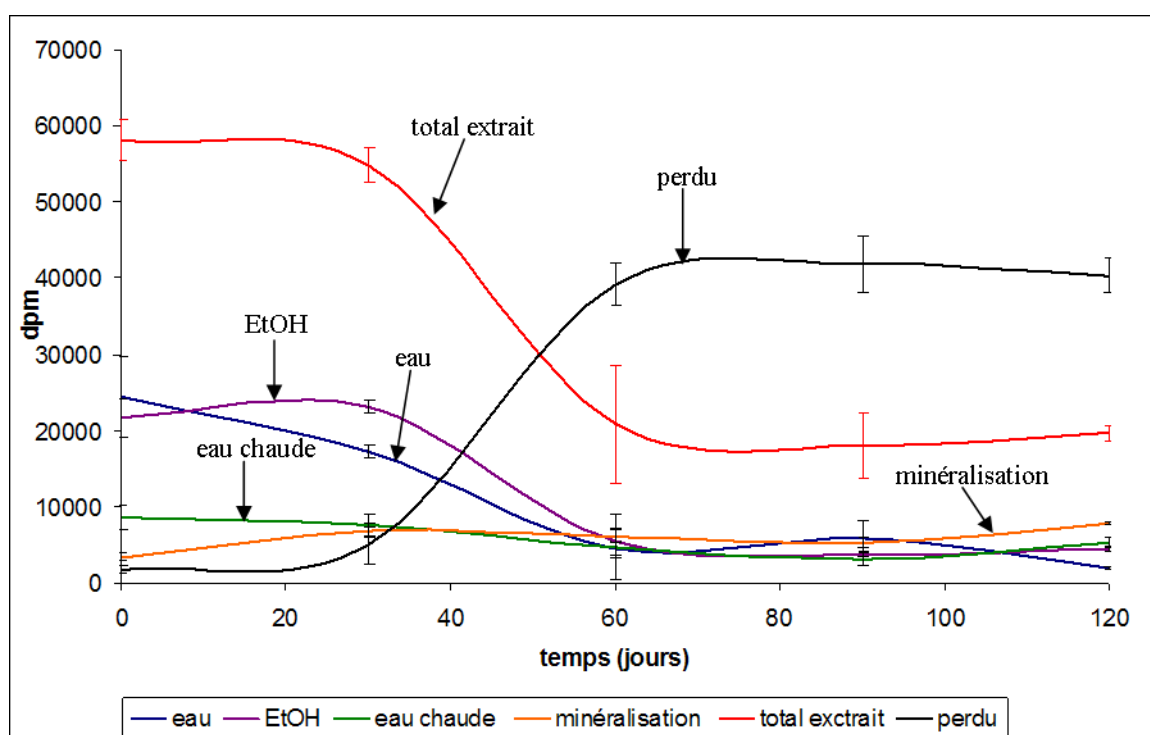


Figure IV, 18 : Evolution sur une période de 120 jours du stock d'aclonifen appliqué à la dose agronomique en couche homogène sur un sol agricole.

En conclusion, au cours du temps la quantité de matière active diminue fortement (jusqu'à 60% de la quantité déposée qui disparaît du bilan radioactif sans explication plausible de notre part). Parmi ce qui est retrouvé, la plus grande part ne migre pas dans les pots d'expérimentation. Il faut cependant noter que les apports d'eau sur le dispositif expérimental ont été modestes (pas d'entraînement macroporeux). La dernière remarque concerne la part de

matière active qui de manière croissante dans le temps augmente par association avec le complexe argilo-humique et devient de plus en plus difficile à remettre en équilibre avec l'eau du sol afin d'y jouer un rôle herbicide.

La figure IV, 18 présentée ci-dessus résume l'évolution du contenu en aclonifen lors d'un traitement de surface entre T0 et T120 jours.

4) Mise en évidence de la présence d'aclonifen et de certains métabolites dans le sol entre 90 et 120 jours.



Figure IV, 19 : Autoradiographie de chromatogrammes d'extraits acétoniques de carottes de sols prélevées à différentes dates (90-100-120 jours) après traitement à l'acilonifen (20 mg/pot + 125 nmoles radioactif). Support silice, solvant EP/Et₂O/ (3/1 :v/v) et EP/Acétone/Acide acétique (35/25/0,05). Ligne 1 = acilonifen témoin (2000 dpm), Ligne 2 = 90 jours, fraction éther de pétrole issue d'un partage de l'extrait acétonique (2000 dpm) et Ligne 3 = 90 jours, phase hydroacétonique issue du même partage (1000 dpm). Ligne 4 = 100 jours, extrait acétonique brut (2000 dpm), Ligne 5 = 120 jours, extrait hydroacétonique après partage contre l'éther de pétrole (1000 dpm), et Ligne 6 = 120 jours, extrait acétonique total avant partage (1000 dpm).

La figure IV, 19 montre la composition dans un certain nombre d'extraits de sols prélevés à des temps longs suite à un traitement de surface avec l'aclonifen. Les prélèvements sont réalisés à T90, 100 et 120 jours, à l'emporte-pièce et les échantillons prélevés sont extraits par de l'acétone. Cet extrait brut concentré est soit déposé directement sur plaque de silice, soit, partagé avant dépôt contre de l'éther de pétrole pour séparer les molécules les plus polaires des plus apolaires (extrait hydroacétonique et extrait éther de pétrole).

Le sol prélevé à 90 jours montre au minimum 4 structures chimiques différentes issues de l'aclonifen déposé : dans la phase EP après partage de l'extrait acétonique, l'aclonifen (le plus lipophile) est majoritaire (68%), un spot à Rf légèrement plus faible compte pour 9%, suivi d'un autre métabolite à 15%. Un spot de Rf 0 représentant 7% du dépôt initial correspond à une ou plusieurs molécules polaires superposées. Dans la phase hydroacétonique issue du prélèvement à 90 jours apparaissent deux spots : un Rf zéro pour une ou un ensemble de molécules polaires (75% de l'ensemble extrait), le reste (20%) est représenté par une molécule semi polaire déjà vue dans l'extrait EP.

L'extrait de sol à 100 jours est qualitativement semblable à ce qui est observé à 9 jours (aclonifen plus 2 métabolites qui migrent et un ensemble avec un Rf zéro). Du point de vue quantitatif la différence majeure entre 90 et 100 jours semble être un rapport aclonifen sur métabolites qui montre une accélération de la métabolisation de l'aclonifen (à T100 jours l'aclonifen ne représente plus que 31% de l'extrait et le métabolite le plus hydrophile ayant migré 47%). La situation à 120 j montre que la quantité d'aclonifen non transformé a encore diminué.

A ce stade de nos expérimentations nous pouvons dire que l'aclonifen présente dans le sol une assez forte stabilité chimique. Le caractère fortement lipophile de la molécule lui permet de ne pas migrer rapidement vers les profondeurs du sol (dosages dans les carottes : l'essentiel des quantités déposées reste dans le 1^{er} cm de sol). Les analyses complémentaires effectuées pour des temps longs (T90, 100, 120 jours) montrent que de la transformation biotique ou abiotique a lieu dans le type de sol que nous avons utilisé. Parmi ces métabolites deux migrent dans notre système chromatographique avec des Rf inférieurs à celui de l'aclonifen, la molécule avec le Rf le plus faible a tendance à augmenter au cours du temps au fur et à mesure que la teneur en aclonifen disparaît.

A ce stade de notre étude nous ne pouvons rien dire des structures chimiques des métabolites observés sur les autoradiographies. Simplement nous savons :

1) que deux métabolites migrent moins que l'aclonifen dans notre système chromatographique (hydroxylation ou coupure au niveau de l'oxygène liant les deux phényles de l'aclonifen ?),

2) qu'un ou plusieurs métabolites très polaires restent, au point de dépôt chromatographique,

3) qu'un métabolite augmente avec le temps tandis que l'aclonifen disparaît. Compte tenu de fait que l'aclonifen radioactif fourni par notre partenaire n'est marqué que sur le noyau phényle substitué nous ne sommes pas en mesure à ce stade de notre étude de certifier

que les métabolites conservent une structure de diphényléther ou si nous avons des structures phényles provenant de la rupture du pont oxygéné caractéristique des DPE.

CHAPITRE V

A LA RECHERCHE D'UNE SELECTIVITE DU COLZA VIS-A-VIS DE L'ACLONIFEN

Le colza est une culture d'intérêt mondial du fait de la richesse en huile de ses graines (40 – 45%). Son tourteau riche en protéines, est aussi largement utilisé en alimentation animale. Les principaux producteurs sont l'Union Européenne, le Canada, les Etats-Unis, l'Australie, la Chine et l'Inde, les surfaces cultivées représentent un total proche de 25 millions d'hectares. La production mondiale de colza s'est élevée à 57 millions de tonnes en 2009 (source FAO). Avec une production annuelle de l'ordre de 5,5 millions de tonnes, la France est le premier producteur d'oléagineux en Europe. Colza, tournesol, soja et lin oléagineux font partie des cultures-clés pour le maintien de rotations équilibrées. En ce qui concerne le colza, l'augmentation des surfaces cultivées en France (828 000 ha en 1988, 1 750 000 ha en 2010) fait de cet oléagineux l'une des principales grandes cultures après le blé et le maïs, ainsi que la principale tête de rotation des systèmes céréaliers (Cetiom, 2010). L'utilisation recherchée de cette huile comme bio-carburant entraîne au niveau mondial une extension des surfaces cultivées et, par là même, une augmentation du marché herbicide sur cette culture (Canolacouncil, 2009). Après d'autres, notre travail a montré que l'utilisation classique du Challenge 600 en pré-levée était phytotoxique pour le colza (comme sur la majorité des Brassicassae). Notre partenaire industriel nous a demandé d'explorer si, par modification d'emploi de l'aclonifen, il était possible de mettre en évidence une sélectivité colza/aclonifen sachant qu'en pré-levée actuelle aucune sélectivité même partielle n'a été observée sur cette culture. Au contraire, nos résultats montrent que le colza est une espèce très sensible lorsque l'herbicide étudié est positionné à la surface du sol. Ainsi, la question qui conduit à ce chapitre de thèse est la suivante : **Existe-t-il un espace de sélectivité de position possible entre la culture de colza et ses adventices en jouant sur l'époque et le mode de traitement ?** Il s'agit par exemple, de savoir si on peut envisager un traitement avec le Challenge 600 en post-levée précoce ou tardive et miser sur le fait qu'au moment du traitement le colza déjà enraciné échappe aux effets physiologiques du simple fait d'un enracinement suffisamment profond permettant d'éviter l'herbicide ? Le succès d'une telle stratégie supposerait qu'à partir de la formulation Challenge 600 (suspension concentrée, ou « flow », adaptée à une stratégie de prélevée) la possible pénétration foliaire soit suffisante

pour entraîner une concentration interne suffisamment faible pour être dépourvue d'effets toxiques notable sur la culture.

Le protocole expérimental qui va être décrit est réalisé en serre sans contrôle précis de température, de lumière et d'H.R. La lumière est celle filtrant par une verrière à partir de la lumière du jour durant la période allant du 24 septembre à la fin novembre 2007.

I) Mise en place d'un traitement de post-levée sur colza avec le Challenge 600.

A) Matériel et méthodes

1) Conduite de la culture des plantes.

Les cultures sont réalisées dans de grands pots de plastique noir de 30 cm de diamètre et de 25 cm de hauteur. Chaque pot est rempli de 20 litres d'un mélange homogène de terre franche/terreau/sable (1/1/1 : v/v/v). La surface de culture par pot est de 0,07 m². Chaque pot est hydraté jusqu'à obtenir l'état maximal de rétention hydrique du mélange correspondant à la capacité au champ.

Trois pots (3 répliquas) sont préparés pour chacune des quatre situations expérimentales choisies, à savoir : témoin, un traitement de pré-levée (classique), un traitement de post-levée précoce et un traitement de post-levée tardive (soit un total de 12 pots installés en serre, figure V, 1). Les doses appliquées correspondent à la dose agronomique.

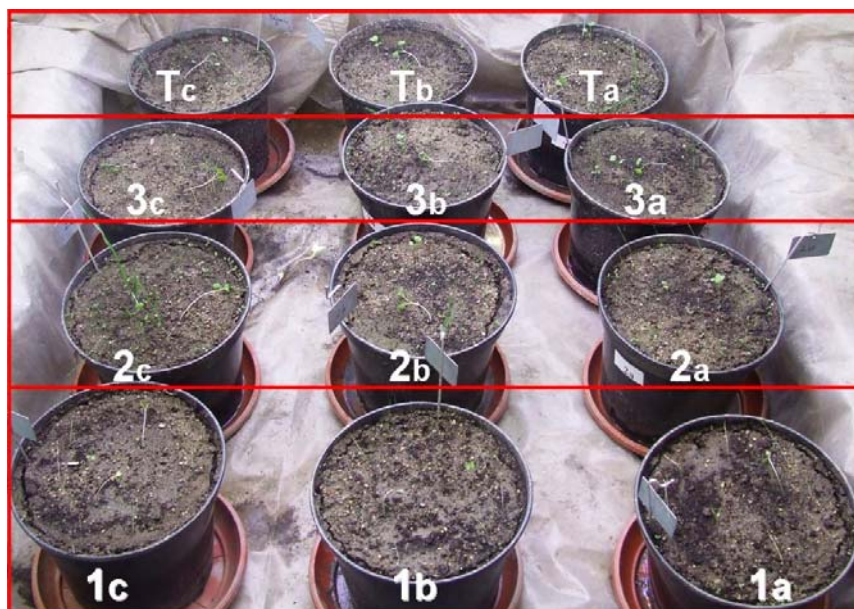


Figure V, 1 : Dispositif expérimental de culture pour colza et adventices. Chaque situation expérimentale correspond à 3 répliquas. Trois pots servent de témoins (Ta, Tb, Tc), trois sont traités en pré-levée (1a, b, c), trois seront traités en post-levée précoce (2a, 2b, 2c) et enfin, trois en post-levée tardive (3a, b, c). La photographie illustrant cette figure est prise 10 jours après le semis et le traitement de pré-levée.

2) Les plantes mises en culture.

Les semences utilisées dans cette expérimentation sont mises à gonfler dans l'eau pendant une nuit. Le début de germination est alors suffisant pour éliminer les semences présentant un défaut de germination. En surface de chaque pot sont installés 2 colza, 10 vulpins et 4 moutardes sauvages. Les éventuelles plantules issues de semences apportées par le substrat sont conservées. C'est le cas d'individus de *Lamium* sp., de moutarde sauvage, d'*Oxalis* sp. et d'*Equisetum* sp.

3) Préparation de l'herbicide et dates de traitement.

Le traitement a été effectué avec du Challenge 600 (matière active + agents de formulation adaptés à un traitement de pré-levée) à la dose homologuée pour les traitements au champ. Afin de mesurer en fin d'expérimentation le contenu interne en aclonifen des plantes, nous avons ajouté, à cette préparation homologuée, de l'aclonifen marqué (la quantité faible d'aclonifen radioactif ne change pas le dosage souhaité). Un volume de 0,4 ml de Challenge 600 représentant 240 mg de matière active est mis en suspension dans 600 ml d'eau. Cette quantité est suffisante pour traiter avec la même préparation homogène tous les essais envisagés (9 pots subissent le traitement homologué, soit 20 mg de matière active par pot). A ces 600 ml de préparation sont ajoutés 150 µl de solution mère radioactive (111.500.000 dpm) ce qui donne à la suspension réalisée **une activité spécifique de 125 dpm/nmole**. La suspension additionnée de radioactivité est soumise à forte agitation durant 48h puis est gardée à 4°C jusqu'à utilisation.

Le traitement de chaque pot est effectué avec 50 ml de suspension ainsi préparée (cela correspond à 150 l/ha), à l'aide d'un pulvérisateur à air comprimé. L'opération se déroule sous hotte aspirante, le dispositif expérimental étant protégé d'une feuille de plastique pour contenir les éventuelles projections.

Le semis (colza et adventices) des semences gonflées est effectué pour les 12 pots en expérimentation le 24 septembre 2007. Les **dates de traitement** ont été les suivantes. Pour l'expérience de **prélevée**, la pulvérisation est effectuée le jour du semis le **24 septembre** 2007. Le traitement de **post-levée précoce** a lieu un mois plus tard alors que les plantes se sont déjà développées (figure V, 2a) : le **24 octobre** 2007. Enfin, le traitement de **post-levée tardif** est réalisé alors que la végétation est déjà très développée (figure V, 2b) c'est-à-dire le **6 novembre** 2007 soit 44 jours après le semis.



Figure V, 2 : Etat de la culture lors du traitement de post-levée précoce (2a = 30 jours après le semis), et lors du traitement de post-levée tardive (3a = 44 jours après le semis)

4) Exploitation de l'expérience.

Les symptômes liés à l'emploi de l'herbicide à la dose homologuée pour le traitement en plein champ ont été suivis, ce qui a donné lieu à un certain nombre de photographies retraçant l'apparition de la dépigmentation mais aussi l'apparition de zones nécrotiques (figure V, 3). Il faut rappeler que ces nécroses ont pour origine la production photo-dépendante de formes radicalaires et que l'intensité lumineuse dans la serre est aléatoire compte tenu de l'éclairage naturel lié aux conditions météorologiques. Nous avons mesuré au luxmètre l'énergie reçue sur et dans la serre par temps couvert (expérimentation fin septembre-novembre 2007). Nous avons obtenu 6800 lux sur la serre, 1200 lux au même moment dans la serre au niveau des cultures et 1800 lux grâce à l'appoint lumineux que nous avons installé. Ces conditions lumineuses ne sont pas très favorables à l'obtention de nécroses sur les feuilles des plantes traitées. Par contre, nous avons observé qu'une courte période d'ensoleillement déclenche très rapidement les phénomènes nécrotiques irréversibles.

Lorsque les symptômes sont franchement observables (dépigmentation, nécroses ou les deux), les parties aériennes des végétaux atteints sont prélevées. Les mesures de masses fraîches et sèches sont effectuées. Sur les parties atteintes, les teneurs en aclonifén sont mesurées par scintillation liquide après minéralisation des échantillons (mélange de minéralisation et piège à KOH pour le CO₂ radioactif produit). Les valeurs des dosages servent à mesurer les concentrations internes en herbicide présentes dans les parties aériennes des plantes soumises à expérimentation.

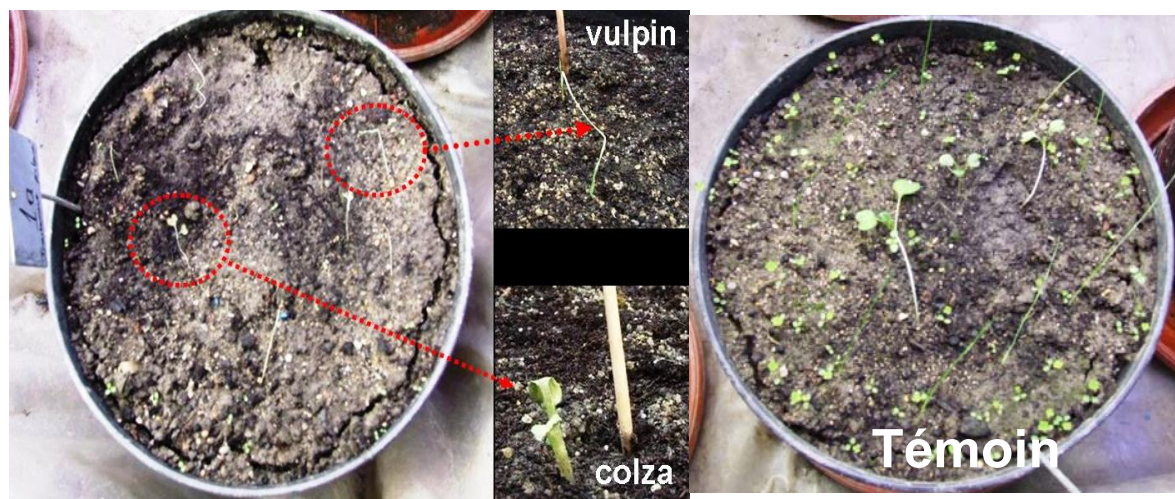


Figure V, 3 : Photographies de plantes après traitement et apparition des symptômes. C'est à ces stades qu'ont été prélevées les parties aériennes pour dosage des quantités ayant entraîné les symptômes.

B) Résultats

1) Homogénéité du traitement.

Afin de s'assurer de l'homogénéité du traitement effectué par pulvérisation (50 ml de suspension aqueuse pour chaque pot), quatre échantillons de substrat (de 1 cm² sur 1 cm de profondeur) sont prélevés sur un pot juste après le traitement. Le substrat prélevé est minéralisé afin d'évaluer la teneur en aclonifen par unité de surface. La valeur théorique est de 13500 dpm/cm² (50 ml d'une suspension contenant 9.500.000 dpm d'aclonifen marqué pour une surface de 0,07 m²), soit **108 nmoles/cm²**. La moyenne des valeurs mesurées est de 11700 ± 460 dpm/cm², ce qui représente environ 88% de la quantité théorique calculée. Le système de pulvérisation employé est donc satisfaisant pour assurer un traitement largement homogène. Ceci est valable pour le traitement de prélevée plus facile à réaliser de manière homogène que le traitement de postlevée réalisé à la fois sur feuilles et sur sol.

Dans le cas des traitements de post-levée précoce et tardive nous pensons avoir manipulé de manière aussi homogène que pour le traitement de pré-levée mais dans ces deux cas l'homogénéité n'a pas été vérifiée car le matériel végétal était déjà présent en abondance pour la post-levée précoce et, pratiquement toute la surface des pots était recouverte de feuilles lors du traitement de post-levée tardive. Dans ces deux derniers cas, des gouttes se sont formées à la surface cireuse des feuilles, certaines ont roulé sur le substrat mais il est clair qu'au niveau de ce dernier traitement la couverture herbicide n'était pas complètement homogène sur les surfaces foliaires et encore moins sur le sol.

2) Cinétique de croissance des végétaux et cinétique d'apparition des symptômes.

Une illustration de la croissance des plantes en fonction du traitement appliqué est présentée figure V, 4.



Figure V, 4 : Etat de croissance des plantes : colonne de droite photographies des témoins au moment du dosage, colonne de gauche photographie de la culture au moment du traitement, et enfin, colonne du centre photographies des cultures au moment du prélèvement des plantes pour dosage. Du haut en bas : prélevée, post-levée précoce, post-levée tardive.

La figure V, 5 illustre les variations de masse fraîche des parties aériennes des plantes témoins comparées aux plantes ayant subi un traitement quel qu'il soit. Les points à 15 jours font référence au traitement de prélevée effectué à T0, le point 50 jours correspond au résultat du traitement de post-levée précoce effectué à T30 et le point 80 jours correspond au résultat du traitement de post-levée tardive effectué à T50.

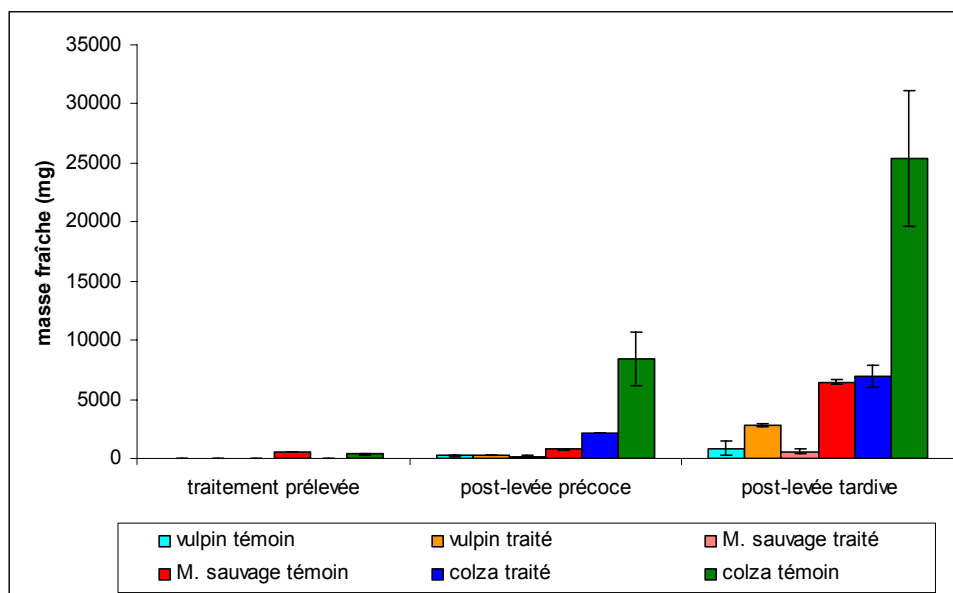


Figure V, 5 : Evolution de la masse fraîche des parties aériennes chez des plantes traitées à l'acilonifen suivant différents traitements : pré-levée traitement à T0 et prélèvement à T15, post-levée précoce traitement à T30 prélèvement à T50 et post-levée tardive traitement à T50 et prélèvement à T80.

Tableau V, 1 : Valeurs des masses fraîches (mg) des parties aériennes des plantes utilisées pour les dosages en acilonifen suite aux trois traitements utilisés : pré-levée (traitement à T0 et prélèvement à T15), post-levée précoce (traitement à T30 et prélèvement à T50), et post-levée tardive (traitement à T50 et prélèvement à T80).

Dates de prélèvements (jours après semis)	T0	T15	T50	T80
Vulpin témoin	0	15±2	226±76	844±584
Vulpin traité	0	7±0	317±178	2826±2566
Colza témoin	0	356±61	8398±2251	25376±5789
Colza traité	0	11±0	2113±913	6946±3256
M. sauvage témoin	0	531±112	741±210	6478±536
M. sauvage traitée	0	31±0	196±20	560±184

L'effet du traitement quel qu'il soit, a une conséquence importante sur la masse fraîche foliaire. Les pertes de masses sont les plus significatives en prélevée, les moutardes sauvages et les colza perdent près de 95% de leur masse. Le vulpin résiste mieux et ne perd que 50% de sa masse par rapport au témoin. En post-levée les pertes de masse fraîche chez le colza et la

moutarde sont de même ordre et sont voisines de 75%. Pour les résultats obtenus avec le vulpin les plantes traitées montrent une biomasse supérieure aux témoins : une légère différence positive pour les plantes traitées pourrait s'expliquer du fait que lors du traitement de post-levée tardive certains vulpins échapperaient au traitement (croissance sous les feuilles de colza). La différence obtenue à T80 est encore plus flagrante du fait de l'élimination du colza et de la moutarde (ce qui n'est pas le cas dans le pot témoin).

Au moment où sont récoltées les feuilles pour dosage du contenu en aclonifen, les nécroses sont parfois apparentes mais pas en quantités suffisantes pour que le stress par déshydratation occasionnée par ces nécroses soit suffisant pour changer l'hydratation des plantes. (colza témoin entre 91 et 95% d'eau, colza traité 81 à 93%, vulpin témoin 84 à 89% vulpin traité 76 à 90%, moutarde témoin 92 à 94% moutarde traitée 71 à 95%). Ainsi, dans notre serre où la température a oscillé entre 8 et 20°C lors de notre expérimentation, les teneurs en eau entre témoins et plantules plus moins nécrosées ne varient pas énormément.

3) Concentrations internes mesurées dans les parties aériennes des plantes montrant des symptômes après trois types de traitement.

3a) Analyse des concentrations internes dans les feuilles de colza, de vulpin et de moutarde sauvage suite au traitement de pré-levée.

Suite au traitement de pré-levée, les plantes en développement sont en contact direct par le sol et l'eau du sol avec l'aclonifen. Compte tenu du dosage appliqué (celui homologué pour le plein champ), les symptômes de phytotoxicité («bleaching» et nécroses) apparaissent rapidement ce qui fait que la biomasse accumulée par individu est faible. Aussi, compte tenu d'un échantillonnage faible en masse nous avons réuni espèce par espèce (sauf pour la moutarde sauvage) tous les individus disponibles pour l'analyse du contenu foliaire en aclonifen.

Les parties aériennes récoltées 10 jours après le traitement présentent des signes nets de dépigmentation et de nécroses sur les 3 espèces mises en expérimentation. Les concentrations en aclonifen dans les parties aériennes sont exprimées figure V, 6.

Les feuilles de **colza** ont une masse fraîche de 11,3 mg et donnent une masse sèche de 2,3 mg (79,3 % d'eau par rapport à la masse fraîche). Le résultat de comptage de radioactivité est de 70 dpm/mg MS = 0,56 nmoles/mg MS soit 70 nmoles/g MF (**70 nmoles/ml de volume foliaire = 70 µM**).

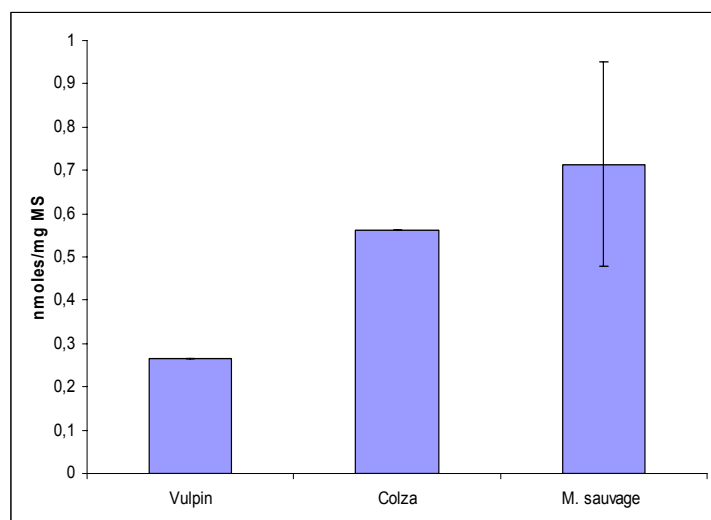


Figure V, 6: Concentrations en aclonifen mesurées dans les parties aériennes de différentes espèces soumises à un traitement de prélevée (Challenge 600 à la dose homologuée). Situation 10 jours après le traitement. Les échantillons de vulpin et de colza étaient trop peu importants pour multiplier l'échantillonnage. Moutarde sauvage : 3 réplicats

Les feuilles de **vulpin** ont une masse fraîche de 6,8 mg et donnent une masse sèche de 1,5 mg (77,6 % d'eau par rapport à la masse fraîche). Le résultat du comptage de radioactivité est de 33 dpm/mg MS = 0,3 nmoles/mg de MS soit 32,5 nmoles/g de MF (**32,5 nmoles/ml de volume cellulaire = 32,5 μ M**).

Les feuilles de **moutarde sauvage** ont une masse fraîche de 31,1 mg et donnent une masse sèche de 5,4 mg (82,8 % d'eau par rapport à la masse fraîche). Le résultat du comptage de radioactivité est de 75 dpm/mg MS = 0,60 nmoles/mg de MS soit 75 nmoles/g de MF (**75 nmoles/ml de volume cellulaire = 75 μ M**).

La comparaison des trois espèces végétales mises en expérimentation montre que les concentrations critiques létales obtenues sont de 33 μ M pour le vulpin, 70 μ M pour le colza et 75 μ M pour la moutarde sauvage. Ces variations sont, à notre sens, à relier aux différences de sensibilité des espèces concernées (déjà mentionnées dans le chapitre sur les symptômes). Par exemple, ici, la moutarde sauvage résiste un peu mieux que le vulpin et le colza et cela se traduit par une croissance plus importante et une teneur en eau un peu plus forte (liée au fait que les nécroses apparaissent plus tardivement), un chargement en herbicide plus intense (grâce à une transpiration encore efficace) ou qui dure plus longtemps entraînant une concentration foliaire plus forte en aclonifen. Malgré cela les différences entre espèces restent modestes. **Ainsi, suite à un traitement de pré-levée avec l'aclonifen on peut avancer une valeur de concentration critique moyenne située entre 30 et 75 μ M dans l'espace cible.**

3b) Analyse des concentrations internes dans les feuilles de colza, de vulpin et de moutarde sauvage suite au traitement de post-levée précoce.

Les plantes traitées en post-levée précoce ont 30 jours de culture lors du traitement et sont prélevées pour dosage à T50 soit 20 jours après le traitement. La figure V, 7 montre l'état des plantes récoltées pour effectuer les mesures de concentration interne en aclonifen dans les parties aériennes.



Figure V, 7: Photographies des plantes ayant subi le traitement post-levée précoce (T50 j après le semis). A T20 j après le traitement. a) « Témoin » : colza, vulpin et moutarde sauvage, b) plantes traitées : colza, moutarde sauvage, oxalis, vulpin.

Dans cette expérience, les plantes prélevées sont nettement plus développées que dans l'expérience précédente, ce qui permet de faire une analyse plante par plante et de calculer une moyenne et un écart type. Les résultats sont présentés à la figure V, 8.

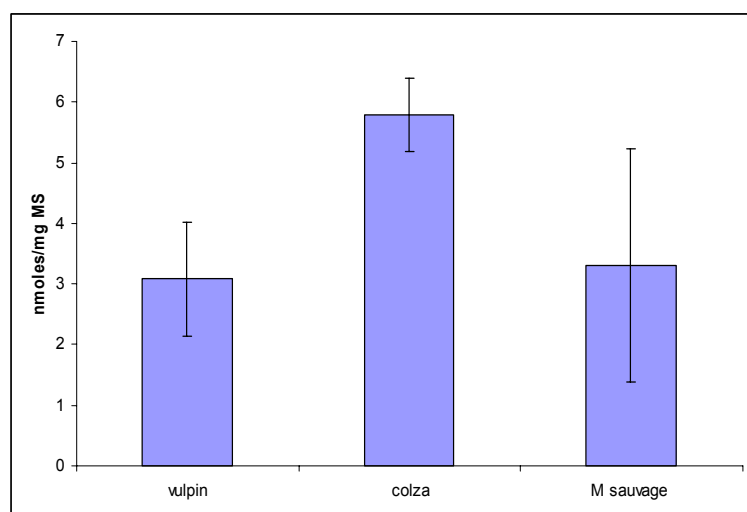


Figure V, 8 : Concentration interne en aclonifen dans les parties aériennes de plants de vulpin, colza, moutarde sauvage traités en post levée précoce à T30 après semis et prélevés à T50 soit 20 jours après le traitement. Les résultats sont exprimés en nmoles/mg MS et représentent la moyenne \pm écartype de 3 expériences.

Par plant de **colza** la masse fraîche de feuille est égale à $2269,7 \pm 619,7$ mg et une masse sèche de $181,0 \pm 42,3$ mg. Le résultat du comptage de radioactivité est de 723 dpm/mg MS = 5,79 nmoles/mg MS soit 470 nmoles/g MF (**470 nmoles/ml de volume cellulaire = 470 μ M**).

Par plant de **vulpin** la masse fraîche de feuille est égale à $323,8 \pm 98$ mg et une masse sèche de $34,3 \pm 10,6$ mg. Le résultat du comptage de radioactivité est de 385 dpm/mg MS = 3,08 nmoles/mg MS soit 353 nmoles/g MF (**353 nmoles/ml de volume cellulaire = 353 μ M**).

Par plant de **moutarde sauvage** la masse fraîche de feuille est égale à $196,7 \pm 7,1$ mg et une masse sèche de $24,2 \pm 7,1$. Le résultat du comptage de radioactivité est de 414 dpm/mg MS = 3,31 nmoles/mg MS soit 310 nmoles/g MF (**310 nmoles/ml de volume cellulaire = 310 μ M**).

Au moment du prélèvement, les plantes récoltées présentent les symptômes suivants. Colza : «bleaching» et nécroses particulièrement sur les feuilles néoformées depuis le traitement. Les vieilles feuilles ont une couleur verte atypique qui tend à faire croire à une dégradation pigmentaire certaine mais incomplète. Les vulpins sont complètement dépigmentés avec la zone de nécrose classique à la base des feuilles (limbes couchés sur le substrat). La symptomatologie des moutardes est assez semblable à celle du colza : «bleaching» des parties jeunes et vieilles feuilles aux pigments dégradés.

Les résultats obtenus démontrent :

1) que les trois plantes étudiées n'échappent pas au traitement Challenge 600 appliqué en post-levée précoce (effectué 30 jours après le semis). Cela signifie que, avec la formulation utilisée, la matière active est largement disponible pour une pénétration transcuticulaire à l'origine d'un effet physiologique marqué au niveau de l'espace cible foliaire. La couche apoplastique de cuticule ne représente pas une barrière à la pénétration de l'aclonifen. Une certaine pénétration racinaire reste néanmoins possible.

2) les concentrations atteintes dans les feuilles par traitement de post-levée précoce sont 5 à 10 fois supérieures à celles obtenues par systémie xylémienne suite au traitement de pré-levée (concentrations entre 30 et 75 μ M en pré-levée contre 310 à 470 μ M en post-levée précoce), et,

3) il n'est pas sûr que les concentrations enregistrées dans les organes aériens correspondent bien à de l'aclonifen réellement pénétré dans les feuilles. Nous avons tenté de laver, à l'éthanol, les feuilles traitées pour récupérer la part d'aclonifen ayant cristallisé en surface de feuille suite au séchage des gouttes de traitement. Ce lavage s'est révélé impossible à cause des nécroses foliaires, notre lavage à l'éthanol entraînait aussi la part d'herbicide ayant pénétré dans des cellules, probablement rendues libres pour notre lavage de surface par le dessèchement des tissus.

Le traitement de post-levée précoce avec la formulation Challenge 600 ne met en évidence aucune sélectivité du colza vis-à-vis de l'aclonifen. Avec cette formulation, un transfert transcuticulaire de la matière active suffisant existe pour entraîner la mort

rapide de la culture. Celle-ci stocke des quantités d'herbicide qui semblent supérieures à la concentration critique évaluée plus haut pour la pré-levée. Nos résultats montrent que la concentration interne foliaire létale obtenue en pré-levée sur colza est de 70 μM tandis qu'en post-levée pour un même effet, le traitement à la dose agronomique donne 470 μM soit 6,7 fois plus.

3c) Analyse des concentrations internes dans les feuilles de colza, le vulpin et la moutarde sauvage suite au traitement de post-levée tardive.

Dans cette expérience la végétation recouvre pratiquement complètement le substrat sol (figure V, 9).



Figure V, 9: Etat de la culture en pot à T50 au moment du traitement de post-levée tardive. Particulièrement du colza.

La pulvérisation de la suspension radioactive a été effectuée de manière classique. Celle-ci n'est pas plus homogène que celle de la post-levée précoce et nous avons là aussi des gouttes qui ruissellent plus ou moins sur les feuilles. Aussi, nous ne pouvons pas garantir l'homogénéité du traitement.

Par plant de **colza** la masse fraîche de feuille est de 6946 ± 3256 mg et la masse sèche est de $716,9 \pm 229$ mg. Le résultat du comptage de radioactivité est de 367 dpm/mg MS = 2,93 nmoles/mg MS soit 310 nmoles/g MF (**310 nmoles/ml de volume cellulaire = 310 μM**).

Par plant de **vulpin** la masse fraîche de feuille est égale à 1046 ± 466 mg et une masse sèche de 107 ± 49 mg. Le résultat du comptage de radioactivité est de 202 dpm/mg MS = 1,62 nmoles/mg MS soit 160 nmoles/g MF (**160 nmoles/ml de volume cellulaire = 160 μM**).

Par plant de **moutarde sauvage** la masse fraîche de feuille est égale à 560 ± 536 mg et une masse sèche de 82 ± 48 mg. Le résultat du comptage de radioactivité est de 550 dpm/mg MS = 4,4 nmoles/mg MS soit 118 nmoles/g MF (**118 nmoles/ml de volume cellulaire = 118 μM**).

Les résultats de la post-levée tardive confirment que la pénétration foliaire de l'aclonifen appliqué avec la formulation Challenge 600 est importante. Les valeurs obtenues sont

relativement proches de celles enregistrées précédemment en post-levée précoce (tableau V, 2).

Tableau V, 2 : Comparaison des concentrations en aclonifen atteintes dans les parties aériennes de vulpin, colza et moutarde sauvage suite à différents types de traitement. Les concentrations sont exprimées en μM . (Pour prélevée : vulpins 15 échantillons, colza et moutardes blanches 6. Post-levée précoce et tardive : vulpins 30, colza et moutarde sauvage : 6).

	prélevée	post-levée précoce	post-levée tardive
vulpin	32,5	353 \pm 156	310 \pm 125
moutarde sauvage	75	310 \pm 136	160 \pm 64
colza	70	470 \pm 195	310 \pm 51

Les résultats obtenus dans leur globalité indiquent que l'aclonifen appliqué avec la formulation Challenge 600 n'offre aucune marge de sélectivité pour le colza et que les concentrations obtenues dans les feuilles se traduisant par un effet létal sont très largement supérieures lors des traitements de post-levée en comparaison avec la pré-levée. Notre hypothèse d'une cuticule jouant un rôle de barrière à la pénétration de l'herbicide formulé pour de la pré-levée ne tient pas au regard des résultats rapportés. Avec cette formulation, il faut abandonner l'idée d'une sélectivité possible du colza vis-à-vis de l'aclonifen.

Dans les expériences ci-dessus les concentrations foliaires de l'herbicide pourraient résulter de deux types de pénétration : par voie cuticulaire directe, et par voie racinaire, via le sol. Il fallait donc vérifier l'importance de cette dernière.

En marge de cette expérimentation de post-levée tardive, nous avons diversifié la situation expérimentale comme suit. Sur un pot bien identifié, avant traitement, un plant de colza a eu sa feuille la mieux exposée protégée de la pulvérisation par un film plastique.

Durant la période suivant le traitement la feuille protégée du traitement n'a pas développé de symptômes manifestes obtenus classiquement avec l'aclonifen. Seul le pourtour du limbe était légèrement jaune au moment du prélèvement (30 jours après le traitement). Cette feuille a été pesée, séchée, autoradiographiée (figure V, 10), minéralisée, comptée. Une comparaison a été menée avec une feuille non protégée issue de la même plante de colza (tableau V, 3).

Tableau V, 3 : Contenu foliaire en aclonifen chez le colza suite à un traitement en post-levée tardive : comparaison entre une feuille protégée du traitement (1) et une feuille non protégée (2). Situation 30 j après le traitement.

	MF (mg)	MS (mg)	H ₂ O (%)	dpm/mg MF	dpm/mg MS	nmol/mg MS	[μM]
(1)	1472	144	90.2	4,7	48	0,384	37,6
(2)	802	93	88,5	23,7	205	1,64	189,6

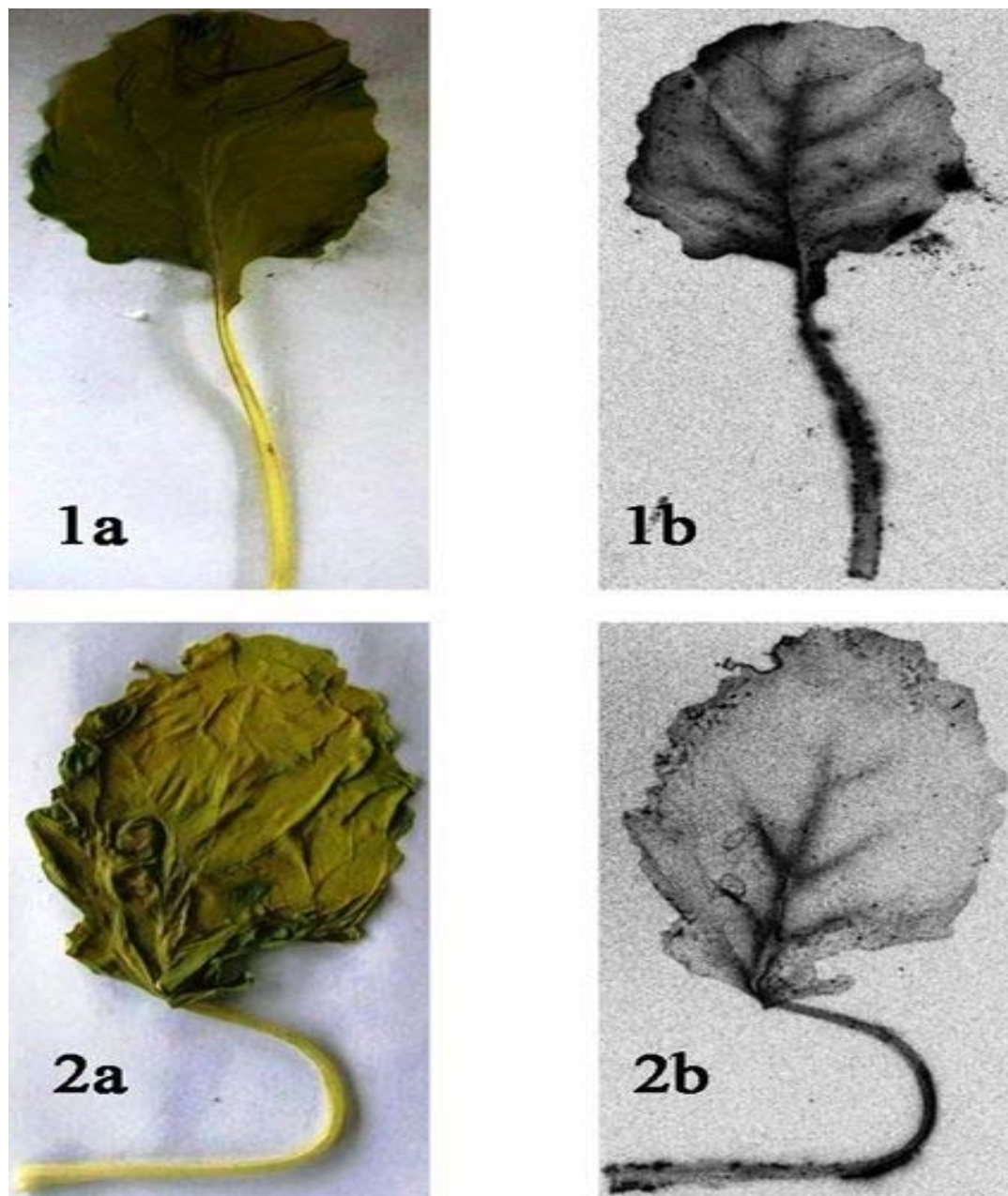


Figure V, 10 : Comparaison par photographie (a) et par autoradiographie (b) de deux feuilles de colza 20 jours après un traitement à l'aclonifen appliqué en post-levée tardive. La feuille 1 n'a pas été protégée, la feuille 2 était recouverte d'un film plastique lors du traitement.

A l'observation des autoradiographies on s'aperçoit que l'aclonifen est très largement présent au niveau du limbe traité alors que la feuille protégée n'a un marquage que sur le pétiole (non protégé), sur une partie des rebords du limbe et sur les nervures principales. Dans cette situation (Figure V, 10), il y a eu migration de produit du pétiole vers le limbe (protégé) par passage dans les faisceaux libéro-ligneux.

Cette expérimentation indique la présence dans la feuille protégée d'une quantité non négligeable d'aclonifen, à raison de 37,6 nmoles/g de masse fraîche (soit environ **37,6 nmoles**

par ml de volume cellulaire = 37,6 μM). Les concentrations élevées observées sur les feuilles non protégées (190 à 470 μM) découlent pour essentiel d'une pénétration foliaire directe. Pour la feuille protégée la concentration interne en aclonifen (38 μM) n'induit pas de symptômes visibles de phytotoxicité au niveau du limbe dans cette expérience. A ce stade de développement, la concentration critique est comme prévu plus élevée qu'au stade plantule. Dans ce cas précis on est sûr qu'à cause de la protection de la feuille, tout l'aclonifen mesuré est bien présent DANS la feuille (comme dans le cas du traitement de pré-levée). A ces concentrations, les symptômes de dépigmentation et nécrose apparaissent en cours d'expérience.

Aussi, on peut conclure que, chez le colza, la concentration critique est située entre 70 μM (expérience de prélevée avec symptômes totaux) et 37 μM (expérience présente) ne donnant pas de symptômes.

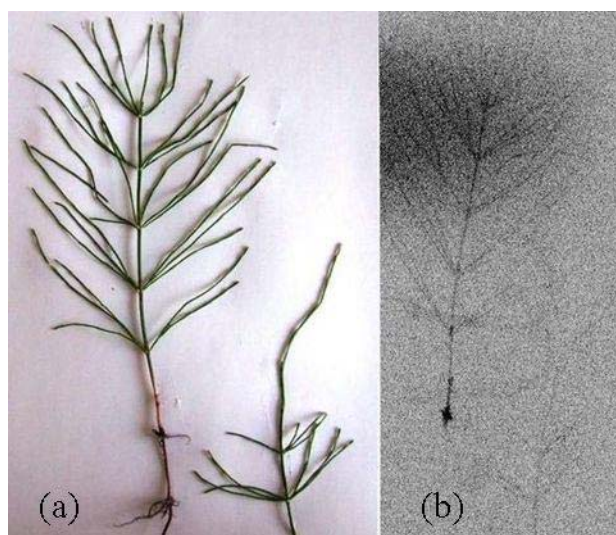
4) Aperçu du contenu en aclonifen sur des plantes sauvages apparues dans nos cultures.

Certaines plantules (*Equisetum sp.*, *Lamium sp.*, *Oxalis sp.*) sont apparues dans nos cultures et ont de ce fait reçu les traitements à l'aclonifen. Elles n'ont pas apparus dans les essais de prélevée mais quelques exemplaires se sont développés dans les pots ayant servi aux traitements de post-levée. Malgré un échantillonnage faible, ces plantes ont été analysées (tableau V, 4). Nous avons été incapable de trouver des symptômes liés au traitement aclonifen chez *Equisetum*. Cette plante appartenant à l'Embranchement des Ptéridophytes accumule l'aclonifen dans les parties aériennes (figure V, 11 et tableau V, 4) : 40 μM pour l'échantillon en prélevée précoce et seulement 10 μM dans l'échantillon issu du traitement post-levée tardive. On peut émettre plusieurs hypothèses : soit les concentrations accumulées sont inefficaces car en dessous de la concentration critique de ces plantes, soit les cibles biochimiques des Ptéridophytes ne sont pas identiques à celles des angiospermes, soit la prêle est dotée d'un équipement enzymatique performant capable de métaboliser la matière active. Pour l'*Oxalis* qui présente de forts symptômes de «bleaching» les concentrations internes (retrouvées dans deux échantillons) sont fortes 920 et 230 μM et plus élevée que celles trouvées pour les plantes mises en culture, traitées en post-levée et détruites par le traitement. Enfin, sur les quatre exemplaires de *Lamium* apparus uniquement dans les pots traités en post-levée tardive, trois présentent un fort «bleaching» (concentrations internes mesurées à 220, 310 et 430 μM) et une plante est complètement sans symptôme avec une concentration interne en aclonifen faible (10 μM), ce qui suggère qu'elle a échappé au traitement, peut-être du fait d'une graine située en dessus de la couche du sol contenant l'herbicide.

Tableau V, 4 : Données expérimentales permettant de calculer la concentration en aclonifen accumulée dans les parties aériennes d'adventices développées d'aventure dans les pots traités en post-levée précoce et tardive. Le *Lamium* noté n° 3 ne présente aucun symptôme alors que les trois autres exemplaires ont des symptômes de «bleaching» très prononcés.

Traitement post-levée précoce							
	MF (mg)	MS (mg)	dpm	dpm/mg MF	dpm/mg MS	nmoles/g MF	Concentration interne (μM)
<i>Equisetum</i>	464	48	2473	5,3	50	40	40
<i>Oxalis</i>	354	65	40770	115	621	920	920
Traitement post-levée tardive							
	MF (mg)	MS (mg)	dpm	dpm/mg MF	dpm/mg MS	nmoles/g MF	Concentration interne (μM)
<i>Oxalis</i>	1372	185	39045	28,44	210	230	230
<i>Equisetum</i>	912	173	739	0,81	4,	10	10
<i>Lamium</i>	996	105		53	501	430	430
<i>Lamium</i>	129	173	50028	38	28	310	310
<i>Lamium</i> (3)	1061	145	880	0,83	6	10	10
<i>Lamium</i>	1962	226	54395	27	240	220	220

Figure V, 11 : Photographie (a) d'un *Equisetum* sp. qui s'est développé en présence d'aclonifen durant le temps de l'expérimentation « traitement post-levée » et autoradiographie (b) de la même plante qui montre que toute la partie aérienne est contaminée sans dommage apparent pour l'organisme ayant subi le traitement.



II) Recherche d'une sélectivité colza/aclonifen en évitant au maximum le contact de l'herbicide avec la semence et la plantule de colza.

A) Matériel et méthodes :

Le paragraphe précédent démontre que les espérances d'une sélectivité colza/aclonifen utilisé en post-levée à partir du Challenge 600 sont nulles. Nous avons alors imaginé d'analyser un traitement qui se rapproche du traitement de prélevée en s'assurant que les semences utilisées dans cette expérience ne se trouvaient pas en contact direct avec l'herbicide. Cela ressemble à la recherche d'une sélectivité de position (figure V, 12).

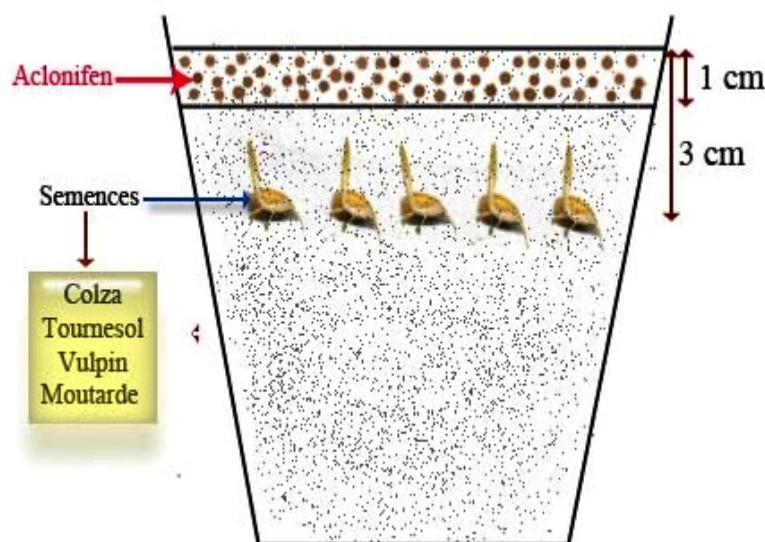


Figure V, 12 : Schéma expérimental précisant la position de la couche de sol contaminé par l'aclonifen et la position des semences.

Dans le cas du traitement de pré-levée, au champ, c'est une suspension de cristaux et d'eau qui est répandue. Après

évaporation de l'eau de traitement, c'est un tapis de cristaux qui se trouve en surface du champ.

Afin d'être sûr d'avoir un traitement de pré-levée le plus homogène possible, nous avons repris le protocole exposé au chapitre IV (paragraphe C, matériel et méthodes) et réalisé des cultures en pot de 20 l en opérant de la manière suivante. Les pots sont remplis de substrat (terre/terreau/sable) jusqu'à 3 cm du bord supérieur. Des semences gonflées par un séjour d'une nuit dans l'eau, sont semées, recouvertes de 2 cm de substrat non contaminé. Le dernier cm de terre correspond à du substrat contaminé de manière homogène par de l'aclonifen formulé et appliqué à la dose agronomique (20 mg de m.a. par pot + aclonifen marqué pour arriver à un mélange à 125 dpm/nmole). La technique d'apport d'herbicide est celle utilisant l'acétone comme solvant de solubilisation du produit formulé imprégnant le substrat (chapitre IV).

B) Résultats :

L'objectif de cette expérimentation est de comprendre si en éloignant le système racinaire des zones contaminées d'une plante celle-ci échappe à la contamination qui ne peut plus se produire que par les autres parties souterraines de la plante : (hypocotyle ou épicotyle souterrains). La question est de savoir si, par ces parties de plantules exposées à du sol contaminé par l'herbicide, une pénétration est possible et, si oui, si les quantités qui pénètrent peuvent atteindre les cibles biochimiques ? et, enfin, si l'espace cible est atteint, y a-t-il un mouvement suffisant de matière active pour avoir un effet phytotoxique ? Si la réponse à ces questions est non, on peut envisager une sélectivité du colza à l'aclonifen pour des raisons de position plante/matière active, par contre, si la réponse est oui cela signifie qu'il n'y a pas de solution de désherbage du colza avec le Challenge 600. Dans cette expérience des semences de vulpin et de moutarde blanche représentent les adventices du colza.

La première constatation expérimentale est que les semences mises à trois cm de profondeur se développent sans problème dans les pots témoins (colza, vulpin, moutarde blanche) ce qui conduit à la présence de longs hypocotyles souterrains chez le colza et la moutarde blanche.

1) La symptomatologie et concentration interne des plantes :

La symptomatologie des plantes soumises au traitement a été évaluée 20 jours après semis (figure V, 13). Pour le vulpin tous les individus observés n'ont pas les mêmes symptômes même si tous sont très différents en taille et couleur des vulpins témoins. La plupart des individus traités présentent du «bleaching» et des nécroses, certains ont soit du «bleaching» soit des nécroses. Enfin, certains individus rares sont encore chlorophylliens avec une couleur verte altérée, signe probable d'une chlorophylle dégradée.

Les individus de colza traités restent au stade cotylédonaire et sont généralement largement nécrosés, certains individus présentant de grandes plages de «bleaching». Quelques individus restent verts avec la même teinte de type chlorophylle dégradée vue chez le vulpin.

Chez la moutarde blanche la majorité des individus est nécrosée avec des cotylédons ratatinés et aucune feuille. Par contre, quelques individus semblent échapper au traitement qui n'induit qu'un retard de croissance.

Malgré un développement racinaire (toujours faible pour les plants traités) du colza hors de la zone contaminée, celui-ci n'échappe pas au traitement aclonifen positionné 3 cm en dessus de la semence. Cela signifie que la partie souterraine de l'hypocotyle de la plantule est capable d'adsorber et d'absorber l'aclonifen, de le transférer vers les zones cibles en quantités suffisantes pour atteindre la concentration critique létale. La situation du colza se retrouve chez le vulpin et en partie chez la moutarde blanche mais, dans ces deux cas, cette situation de toxicité pour ces adventices était souhaitée.

A partir des plantes ayant subi le traitement, un échantillonnage est réalisé pour séparer les parties aériennes et souterraines. Celles-ci sont pesées (MF), déshydratées à 80°C pendant une journée (MS) puis minéralisées pour déterminer la quantité d'aclonifen présente au moment où les symptômes sont déjà très visibles. Ces symptômes n'étant pas toujours homogènes nous avons décidé de faire différents lots : plantes uniquement nécrosées, plantes avec nécroses et «bleaching», «bleaching» seul et enfin début de «bleaching» (plantes décolorées de manière incomplète). Les concentrations internes dans les parties aériennes sont présentées figure V, 13 et tableau V, 5



Figure V, 13 : Plantules de vulpins, moutardes blanches et colza après 20 jours de culture en absence ou en présence d'acлонifen utilisé à la dose agronomique après répartition homogène dans le 1^{er} cm de la culture. Comparaison avec des plantes témoins (gauche de chaque photographie).

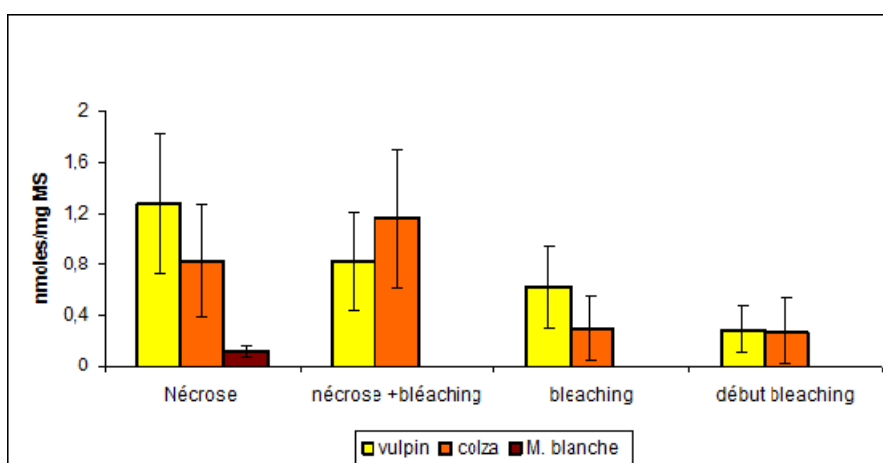


Figure V, 14 : Concentrations en aconitine présentes dans les parties aériennes de colza, vulpin et moutarde blanche après 20 jours de contact avec l'herbicide (dose agronomique). Les plantes analysées ont toutes des symptômes marqués de phytotoxicité. Pour la moutarde blanche seuls des symptômes de nécrose sont visibles, les plantes ne dépassant pas le stade cotylédonaire. Concentrations exprimées en nmoles/mg de masse sèche.

Tableau V, 5 : Concentrations moyennes en aconitine (nmoles/mg MS) dans les parties aériennes de vulpin, colza et moutarde blanche ayant subi un traitement de « prélevée » homogénéisé dans le 1^{er} cm de sol.

	vulpin	colza	M. blanche
nécrose	1,27±0,6	0,83±0,5	0,12±0,1
nécrose+»bleaching»	0,82±0,4	1,16±0,6	-
«bleaching»	0,62±0,3	0,30±0,2	-
début «bleaching»	0,29±0,2	0,28±0,3	-

Les résultats portent ici sur 70 plantules de vulpin (10 nécrotiques, 25 nécroses + «bleaching», 20 «bleaching» et enfin, 15 en début de décoloration). Les plantules de colza utilisées sont au nombre de 41 (10 nécrotiques, 6 nécrose + «bleaching», 8 «bleaching», 19 début de «bleaching»). Les moutardes blanches restent à l'état cotylédonnaire nécrosé (5 échantillons).

L'ensemble de ces résultats rapporté en concentration par rapport à la masse fraîche des parties aériennes donne pour la **moutarde blanche une concentration létale de 10 μM** . Cette concentration interne bloque la plante à l'état de cotylédons qui se nécrosent. Pour le colza nous avons quatre types de symptômes : nécrose + «bleaching» à 120 μM , un début de «bleaching» à 40 μM , un début de nécrose + «bleaching» à 60 μM , et, enfin, des nécroses seules à 88 μM . La gravité des symptômes observés à T20 jours semble corrélée à la concentration interne. Ainsi, **pour le colza** les concentrations toxiques atteintes dans les parties aériennes sont situées **entre 40 et 120 μM** (moyenne 77 μM).

Pour le vulpin, les concentrations toxiques trouvées sont du même ordre (entre **40 et 110 μM**) : 90 pour les plants nécrosés, 110 pour les nécroses + «bleaching», 40 pour le début de «bleaching», et, 60 pour le «bleaching» seul (moyenne 75 μM).

Ces concentrations retrouvées dans les parties aériennes ont pour origine l'aclonifen positionné en prélevée hors de la zone de développement des racines. Nous avons en effet démontré au chapitre précédent que sur une période longue, la couche d'aclonifen positionnée sur le 1^{er} cm de substrat ne bougeait pas de manière significative vers le bas. Il était donc intéressant de comprendre comment et par quel organe la contamination souterraine pouvait s'effectuer pour assurer un effet toxique dans le compartiment foliaire. Aussi, avons-nous recherché les quantités d'aclonifen dans les parties souterraines de nos plantes prélevées à T20 jours (lavées à l'eau puis essorées avant minéralisation) (figure V, 15 et tableau V, 6).

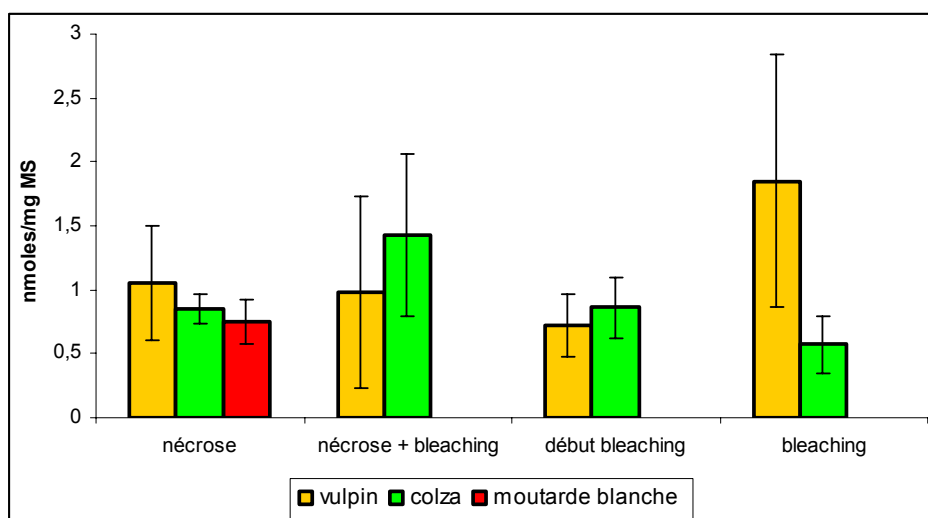


Figure V, 15 : Concentrations en aclonifen présentes dans les parties souterraines de colza, vulpin et moutarde blanche après 20 jours de contact avec l'herbicide (dose agronomique). Les plantes analysées ont toutes des symptômes marqués de phytotoxicité. Pour la moutarde blanche seuls des symptômes de nécrose sont visibles, les plantes ne dépassant pas le stade cotylédonaire. Concentrations exprimées en nmoles/mg de masse sèche.

Tableau V, 6 : Concentrations moyennes en aclonifen (nmoles/mg MS) dans les parties souterraines de vulpin, colza et moutarde blanche ayant subi un traitement de « pré-levée » homogénéisé dans le 1^{er} cm de sol.

	nécrose	nécrose + «bleaching»	début «bleaching»	«bleaching»
vulpin	1,05±0,5	0,98±0,8	0,72±0,2	1,85±0,9
colza	0,85±0,1	1,43±0,6	0,86±0,2	0,57±0,2
moutarde blanche	0,75±0,2	-	-	-

L'échantillonnage correspondant aux résultats exprimés figure V, 15 et tableau V, 6 est le même que celui ayant servi pour les parties aériennes.

Pour le vulpin, la moyenne des concentrations internes pour les parties souterraines est de l'ordre de 75 μ M (nécrosés : 50 μ M, nécroses + «bleaching» : 80 μ M, «bleaching» : 90 μ M, et, début de «bleaching» : 80 μ M).

Pour le colza la situation est semblable, la moyenne est de l'ordre de 60-65 μ M avec nécrose 60 μ M, nécrose + «bleaching» 110 μ M, début de «bleaching» 20 μ M et enfin, début de «bleaching» et nécrose 60 μ M.

L'échantillon de moutarde blanche concernant les parties souterraines est à 50 μ M.

Si l'on compare les concentrations atteintes à 20 jours dans les parties aériennes et souterraines nous obtenons le tableau V, 7.

Tableau V, 7 : Comparaison des concentrations en aclonifen trouvées dans les parties aériennes et souterraines de colza, vulpin, moutarde blanche suite à un traitement de surface. La situation est observée à T 20 jours. Les valeurs affichées sont en μ M.

	Parties aériennes	Parties souterraines
Colza nécroses + «bleaching»	120±34	110±53
Colza début «bleaching»	40±24	20±15
Colza début «bleaching» + nécroses	60±35	60±35
Colza nécroses	88±25	60±12
Vulpin nécroses	90±34	90±51
Vulpin nécroses + «bleaching»	110±39	80±25
Vulpin début «bleaching»	40±18	80±18
Vulpin «bleaching»	60±32	50±22
Moutarde nécrose cotyledons	10±2	50±4

Les valeurs de concentrations exprimées ci-dessus montrent que pour chaque type de symptômes retenus pour l'échantillonnage, la concentration, espèce par espèce, est très

semblable entre les parties aériennes et souterraines. Cette situation est très surprenante pour différentes raisons : 1) les semences sont installées hors de la zone contaminée et le système racinaire a un géotropisme positif ce qui l'éloigne encore plus de la zone contaminée, 2) les parties aériennes qui transpirent peuvent accumuler de la matière active en abondance à partir d'une eau du sol chargée en m.a. La seule explication possible de contamination des parties aériennes est une pénétration dans le végétal par la seule zone en contact avec la couche contaminée, c'est-à-dire l'hypocotyle souterrain. Cela signifie que cette zone végétale aurait des capacités d'absorption importantes et pourrait transférer la matière active par le flux d'eau qui transite vers le haut par systémie xylémienne.

Si l'on considère que la partie souterraine correspondant aux racines n'est pas contaminée cela signifie que l'autre partie souterraine est très contaminée. Nous avons été obligé de vérifier ce point uniquement sur moutarde blanche car avec les autres espèces la quantité de matériel végétal était trop faible.

Le cas de la moutarde blanche : Nous avons déjà signalé que, dans notre expérience, quelques plantes de moutarde blanche échappaient au traitement pour des raisons dont nous ignorons tout. Nous avons, sur de telles plantes au développement pratiquement normal (stade 2 feuilles à 20 jours et chevelu racinaire identique aux témoins), cherché à déterminer les taux de radioactivité dans tous les organes de la plante en prenant soin de séparer en particulier, les parties souterraines issues des zones non contaminées de celles issues de la zone de contact avec l'herbicide. Cela donne 4 échantillons : 2 souterrains (racines et partie de l'hypocotyle ayant grandi à l'obscurité), et 2 aériens : cotylédons + partie supérieure de l'hypocotyle puis épicotyle + feuilles (figure V, 16 et tableau V, 8).

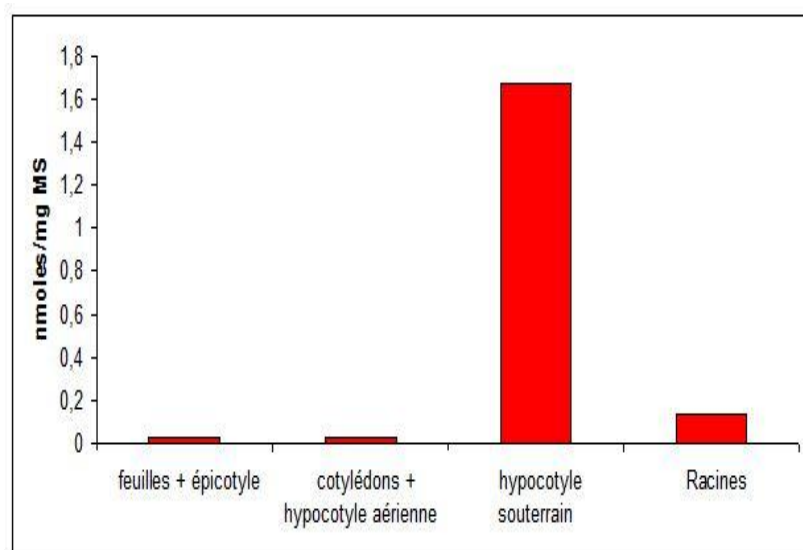


Figure V, 16 : Répartition de l'aclonifen dans différentes parties d'une moutarde blanche âgée de 20 jours et ayant échappé au traitement par l'aclonifen réparti de façon homogène dans le 1^{er} cm de substrat. Les concentrations sont exprimées en nmole/mg de masse sèche.

Tableau V, 8 : Valeurs de concentrations en aclonifen obtenues dans les différents fragments isolés d'un plant de moutarde blanche âgé de 20 jours et ne montrant pas de symptômes liés à la phytotoxicité. En nmoles/mg de masse sèche.

	nmoles/mg MS
feuilles + épicotyle	0,03
cotylédons + hypo. aérien	0,03
hypocotyle souterrain	1,68
racines	0,14

La partie hypocotyle souterrain a une concentration qui représente près de 60 fois (57,8 fois) la concentration en aclonifen trouvée dans les parties aériennes du végétal et 12 fois plus que la concentration racinaire. La concentration dans cette partie souterraine de l'hypocotyle est d'environ 70 μ M. En tenant compte de la masse fraîche des organes prélevés et de la concentration (nmoles/mg MF) on remarque que c'est la partie hypocotyle souterrain qui contient la plus grande quantité d'aclonifen (feuille + épicotyle = 0,58 nmoles, hypocotyle aérien + coléoptile = 0,34 nmoles, hypocotyle souterrain = 2,56 nmoles, racines = 0,39 nmoles). Sur un total de 3,87 nmoles retrouvées dans l'ensemble de la plante, la partie de l'hypocotyle en contact avec la couche de terre traitée en concentre 66%.

Ainsi, l'observation d'une pénétration clairement par la partie souterraine de l'hypocotyle chez la moutarde démontre que, d'une manière générale, chez des plantules soumises à un traitement de prélevée, toutes les parties jeunes souterraines sont en situation d'absorber le pesticide répandu sur le sol. A partir d'une accumulation par la partie souterraine de l'hypocotyle, une redistribution (faible dans le cas traité) vers les parties aériennes doit se faire par systémie xylémienne ce qui signifie une entrée possible à partir des tissus de l'hypocotyle dans le bois primaire des faisceaux conducteurs. L'explication de la présence d'aclonifen dans les racines est plus difficile à trouver si on exclut la possibilité d'entrée directe par les poils absorbants. En effet, nous n'avons pas trouvé d'aclonifen dans la zone de substrat prospectée par les racines qui de ce fait n'ont pas accès à l'herbicide. La présence dans les racines de moutarde d'aclonifen peut être liée à une redistribution de l'herbicide ayant atteint les feuilles photosynthétiques et un transport phloémien descendant vers les méristèmes racinaires. Cela suppose un chargement de l'aclonifen dans les zones sources par pénétration dans les cellules criblées et cellules compagnes du phloème foliaire. Cela n'est pas impossible mais l'aclonifen ne présente pas les caractéristiques physico-chimiques classiques pour un chargement important dans le phloème (à savoir une lipophilie intermédiaire et la présence d'une fonction carboxylique permettant un piégeage d'acide dans une sève élaborée à pH élevé). La dernière hypothèse d'un chargement racinaire à partir de la zone hypocotylaïre contaminée reste la contamination par partition/diffusion dans les

espaces cellulaires des racines et des feuilles. Si une telle hypothèse était valide ici, les concentrations racinaires et foliaires devraient être voisines ce qui n'est pas le cas, la concentration dans les parties racinaires étant 5 fois plus forte que celle des parties aériennes. Concernant les graminées, l'organe qui entre en contact avec la couche contaminée est le coléoptile. Il s'agit d'un organe en forme de fourreau formé d'une couche de cellule. Dans nos expérimentations, à partir de semences placées à 3 cm de profondeur (vulpin), le coléoptile émerge de quelques mm et traverse donc toute la couche contaminée. Cet organe doit fortement se charger en aclonifen mais pour des raisons de position, ne doit pas être en situation de transmettre l'herbicide aux feuilles dont seule la base est en contact avec le coléoptile. La concentration en aclonifen obtenue en fin d'expérimentation n'a pas été mesurée isolément.

2) Equation reliant la concentration critique dans l'espace cible et concentration critique dans sol en pré-levée :

Dans une plante entière, on peut admettre que l'effet létal d'un herbicide soit assuré lorsque l'ensemble des cibles biochimiques est pratiquement bloqué. Ceci peut être explicable avec un inhibiteur de synthèse des caroténoïdes mais moins évident avec un herbicide de type diphenyléthers classique. La concentration obtenue dans l'organe contenant la cible qui déclenche la mort de la plante est appelée la **concentration critique [C]_c (foliaire** dans notre cas). Celle-ci doit être maintenue durant un certain temps afin que les conséquences du blocage soient traduites par un dysfonctionnement physiologique entraînant la mort du végétal. Pour assurer cette concentration critique létale, en traitement de pré-levée, cela implique que le sol soit capable d'assurer un flux d'herbicide suffisant pour alimenter le chargement de l'espace cible. Il faut donc atteindre une **concentration critique dans le sol. ([C]_s)**. Pour que la matière active délivrée sur le sol arrive dans l'espace cible, il faut un flux d'absorption convenable par le sol et les organes souterrains (la racine en général). Suivant le type de sol, la structure de la racine, son positionnement dans le substrat, ce flux dépend de la concentration dans le sol [C]_s.

[C]_s permet d'obtenir une concentration racinaire [C]_R telle que la migration du produit des racines vers l'espace-cible foliaire permette d'atteindre la concentration critique [C]_c dans l'espace cible (ici la feuille).

La relation existant entre [C]_s et [C]_R correspond au paramètre **A**. Sa valeur change en fonction de la nature du sol, de l'espèce végétale et des stades de développement. Ce

paramètre **A** peut, pour des raisons pratiques représenter le rapport des concentrations globales du sol dans la zone racinaire à la concentration globale dans les racines. On peut aussi, en se fondant sur un raisonnement physico-chimique et biologique, calculer **A** à partir des concentrations dans l'eau du sol et dans l'eau de la plante. Au niveau de ce travail c'est la première voie de calcul qui a été retenue.

$$A = \frac{[C]_s}{[C]_R}$$

La relation existant entre $[C]_R$ et $[C]_c$ dépend du flux de migration xylémien. Au stade plantule, sans transpiration forte en général, le rapport

$$T = \frac{[C]_R}{[C]_c}$$

est supérieur à 1, et proche, chez le vulpin d'une valeur de 2 mais pouvant atteindre, chez le moutarde blanche des valeurs bien supérieures (jusqu'à 13,6 ; Tableau V, 11).

Sur des plantes plus développées le rapport $T = [C]_R / [C]_c$ change profondément car le produit se concentre dans les feuilles-cibles du fait de la transpiration. **T** a alors des valeurs égales ou inférieures à 1 (Tableau V, 10).

On élabore ainsi une équation sommaire :

$$[C]_s = [C]_c \times T \times A$$

Cette équation permet de calculer la valeur critique de la concentration dans le sol, qui est, en théorie, celle qu'il faut réaliser dans le sol pour obtenir l'effet herbicide. Les valeurs critiques de $[C]_s$ estimées ici sont : approximativement pour le colza de $100 \times 0,8 \times 1,5 = 120 \mu\text{M}$, pour le vulpin de $75 \times 1,2 \times 1,5 = 135 \mu\text{M}$ et pour le moutarde blanche de $18 \times 3,7 \times 1,8 = 120 \mu\text{M}$

On observe que pour ces 3 plantes, la valeur de $[C]_s$ critique reste très comparable, entre 120 et 170 μM . Cependant ceci résulte de valeurs de **A** et de **T** très dépendantes de l'espèce végétale.

3) Evaluation des concentrations critiques obtenues dans les plantules de vulpin, colza et moutarde blanche traitées à l'aclonifen suite à une application homogène de type pré-levée :

En reprenant les valeurs des concentrations trouvées dans les parties souterraines et les parties aériennes lors des expériences de pré-levée (traitement homogène sur 1 cm de substrat) décrites précédemment dans ce chapitre nous avons tenté d'évaluer, à l'aide de la formule ci-dessus, les concentrations critiques dans le sol pour différentes situations (vulpin, colza,

moutarde blanche). La concentration critique du sol issue de notre traitement homogène de la couche de surface est 108 nmoles/g de substrat.

Les résultats sur le vulpin sont exprimés tableau V, 9 et figure V, 17. Du point de vue statistique 4 groupes de plantes ont été considérés suivant les symptômes : nécrose + «bleaching» = 13 individus, nécrose = 9 individus, «bleaching» = 12 individus, début «bleaching» = 7 individus. L'observation attentive de l'apparition des symptômes indique que le début de la dépigmentation est le 1^{er} symptôme, puis «bleaching» total, ensuite, des individus ont des nécroses sans «bleaching», les individus les plus atteints présentent les deux symptômes.

Tableau V, 9 : Calcul de la concentration critique foliaire obtenue chez le vulpin dans différentes situations de symptômes. Les valeurs exprimées dans les deux 1^{ères} colonnes sont des moyennes (en nmoles/g MF) portant sur un nombre d'individus possédant les mêmes symptômes (précisé dans le texte). A et T sont des rapports sans unités et la dernière colonne correspond à des valeurs de concentration foliaire en μM .

moyenne	parties aériennes	racines	T	A	[C]s critique
nécrose + «bleaching»	101 \pm 33,0	72,6 \pm 40,5	0,72 \pm 0,5	1,49 \pm 0,3	108,3 \pm 13,0
nécrose	85,3 \pm 24,3	64,6 \pm 28,2	0,76 \pm 0,5	1,67 \pm 0,23	108,3 \pm 14,3
«bleaching»	40,3 \pm 14,8	89,5 \pm 70,8	2,22 \pm 0,4	1,21 \pm 0,21	108,3 \pm 14,8
début «bleaching»	40,6 \pm 7,7	79,2 \pm 29,6	1,95 \pm 0,3	1,36 \pm 0,17	107,6 \pm 7,7

Les concentrations critiques foliaires établies avec l'équation présentée plus haut nous donne une fourchette de concentrations internes variables en fonction des symptômes. Ces concentrations sont comprises entre 40 et 100 μM . Compte tenu que nous avons une difficulté d'échantillonnage pour situer tel ou tel individu dans tel ou tel groupe, les concentrations trouvées ne nous semblent pas trop dispersées. Nous ne pensons cependant qu'un gradient de concentration croissant induit des symptômes plus précoces et plus complets. C'est la dépigmentation qui semble s'établir en premier mais cette situation n'est peut être qu'apparente et liée au fait du faible éclaircissement solaire présent dans la serre. La concentration critique foliaire chez le vulpin, avec le type de traitement réalisé (pré-levée « homogène ») se situe autour de 40 μM .

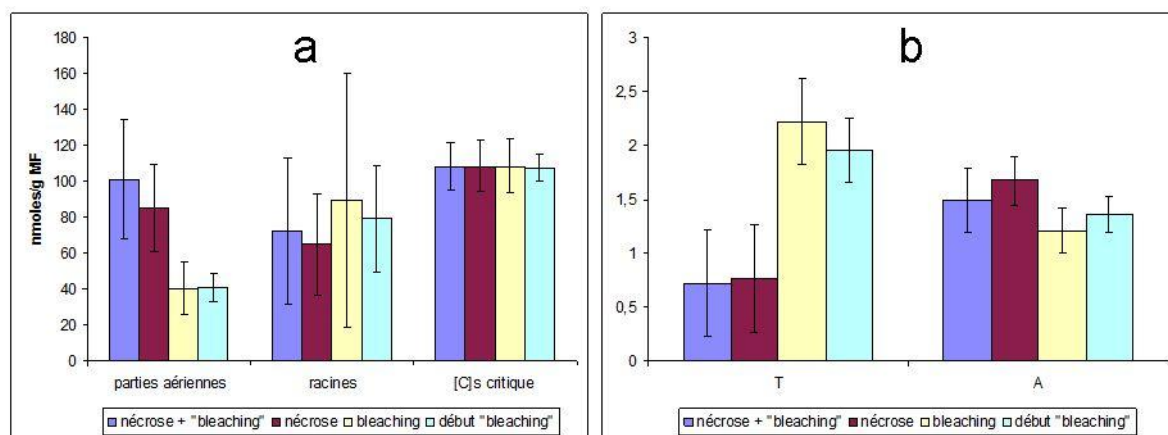


Figure V, 17 : Représentation graphique du contenu en acétonifène dans les parties aériennes et les parties souterraines de vulpins présentant 4 types de symptômes. La dernière barre liée à chaque symptôme correspond à la concentration critique dans le sol ([C]s) calculée induisant les symptômes (ici létaux). b) Valeurs de A et T correspondants.

Avec les plantules de colza la même démarche de calcul a été effectuée. Les plantules de colza soumises au traitement herbicide ont été classées suivant les symptômes obtenus en fin d'expérimentation (T20 j.). Les résultats obtenus sont présentés au tableau V, 10 et figure V, 18. Les résultats montrent une certaine dispersion dans les valeurs de concentrations critiques foliaires suivant les symptômes obtenus. Cette remarque était déjà valable avec le vulpin mais ici la marge de dispersion est plus grande (25 μM à 132 μM). D'après les symptômes nous avons fait 4 lots : nécrose + «bleaching» = 6 individus, nécrose = 5 individus, début «bleaching» + nécrose = 5 individus, et, début «bleaching» = 10 individus. Une nouvelle fois nous pensons que l'obtention des symptômes maximum et rapidement obtenus correspondent à une concentration en excès par rapport à la stricte concentration critique et que dans le cas étudié ici la concentration critique entraînant la mort du colza avec le type de traitement appliqué se situe entre 25 et 75 μM (et non 132 μM).

Tableau V, 10 : Calcul de la concentration critique foliaire obtenue chez le colza dans différentes situations de symptômes. Les valeurs exprimées dans les deux 1^{ères} colonnes sont des moyennes (en nmoles/g MF) portant sur un nombre d'individus possédant les mêmes symptômes (précisé dans le texte). A et T sont des rapports sans unités et la dernière colonne correspond à des valeurs de concentration foliaire en μM .

moyenne	parties aériennes	racines	T	A	[C]s critique
nécrose + «bleaching»	132,5 \pm 41,2	111,0 \pm 15,0	0,84 \pm 0,3	0,97 \pm 0,1	107,9 \pm 21,2
nécrose	83,4 \pm 47,4	62,9 \pm 31,9	0,75 \pm 0,18	1,72 \pm 0,1	107,6 \pm 17,4
début «bleaching» + nécrose	74,5 \pm 39,7	57,8 \pm 21,7	0,76 \pm 0,17	1,87 \pm 0,1	105,8 \pm 9,7
début «bleaching»	24,5 \pm 17,2	22,4 \pm 8,3	0,91 \pm 0,19	4,8 \pm 0,3	107 \pm 7,2

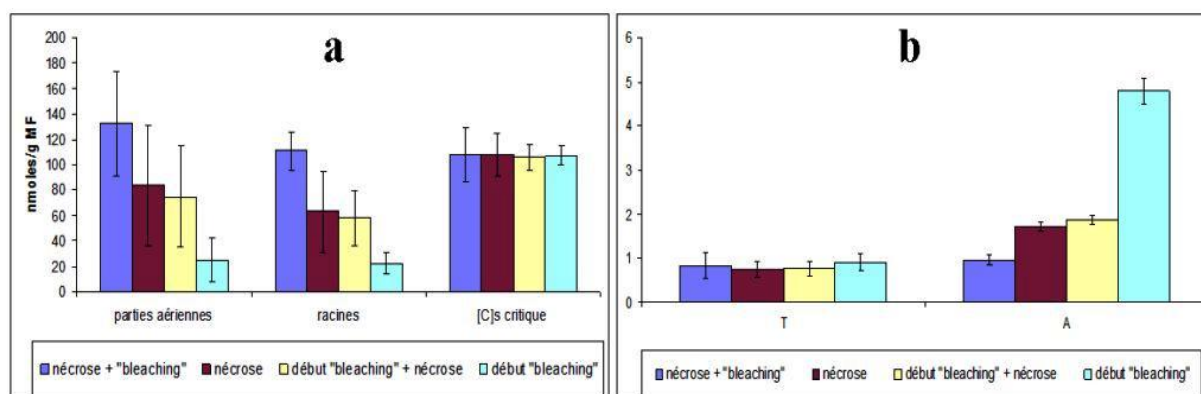


Figure V, 18 : a) Représentation graphique du contenu en aclonifen dans les parties aériennes et les parties souterraines de colza présentant 4 types de symptômes. La dernière barre liée à chaque symptôme correspond à la concentration critique dans le sol ([C]s) calculée induisant les symptômes (ici létaux). b) Valeurs de A et T correspondants.

Les résultats portant sur la moutarde blanche sont rapportés tableau V, 11 et figure V, 19. Il n'existe pour cette plante que deux lots : l'un avec des symptômes nécrotiques (5 individus) et l'autre correspond à un groupe de 3 plantes qui échappent au traitement (cas traité au point « e » de ce chapitre). Pour les moutardes nécrotiques, la concentration critique est évaluée à 65 μM tandis que les moutardes qui échappent au traitement atteignent 37 μM dans les feuilles sans dommages apparents. Dans ce dernier cas nous avons vu que la zone la plus contaminée de la plante était de très loin la zone de l'hypocotyl en contact avec la zone traitée du substrat de culture.

Tableau V, 11 : Calcul de la concentration critique foliaire obtenue chez la moutarde blanche dans différentes situations de symptômes. Les valeurs exprimées dans les deux 1^{ères} colonnes sont des moyennes (en nmol/g MF) portant sur un nombre d'individus possédant les mêmes symptômes (précisé dans le texte). A et T sont des rapports sans unités et la dernière colonne correspond à des valeurs de concentration foliaire en μM .

moutarde blanche	partie aérienne	racines	T	A	[C]s critique
nécrotique	17,8±4,4	65,6±18,9	3,7±0,7	1,64±0,16	108±4,4
aucuns symptômes	2,3±0,8	31,3±21,2	13,6±8,8	3,45±3,2	107,9±0,8

Les moutardes atteintes par le traitement appliqué ont une concentration critique foliaire de 18 μM ce qui est nettement moins que pour le colza et le vulpin. Les plants de moutarde qui échappent au traitement ne concentrent que 2,3 μM d'aclonifen dans l'espace foliaire. La raison pour laquelle certains individus échappent au traitement est pour l'instant obscure. La métabolisation ne semble pas évidente car certains individus atteints par le traitement n'ont pas ces capacités (on ne voit pas pourquoi l'arsenal biochimique des plantes qui échappent à l'aclonifen serait différent de celui des plantes atteintes). Les cibles biochimiques peuvent être

mutées chez certains individus regroupés au sein d'une lignée résistante tandis que les autres individus sensibles ne seraient pas mutés. Cette hypothèse est peu crédible car l'aclonifen a deux cibles biochimiques qui sont bloquées pour des concentrations voisines. On a du mal à imaginer, au sein d'une lignée de moutarde, deux mutations sur les deux sites d'inhibition de l'aclonifen. Pour l'instant, le fait que certaines moutardes blanches échappent au traitement de pré-levée « homogène » n'est pas compris.

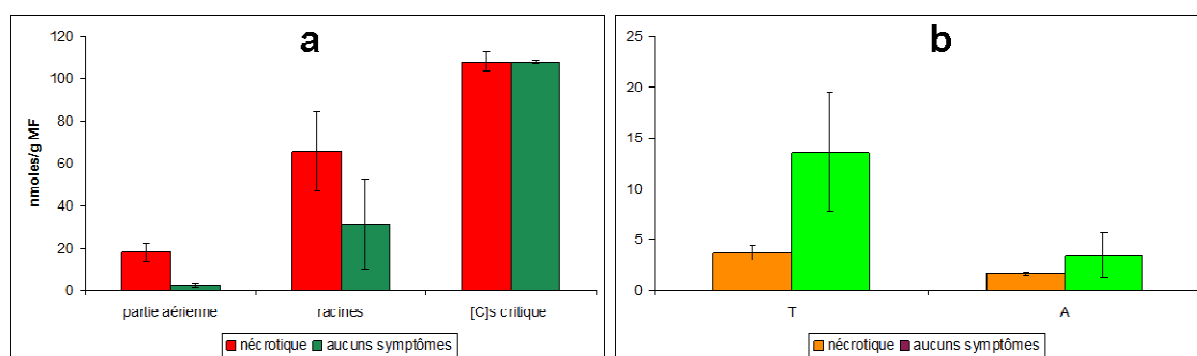


Figure V, 19 : a) Représentation graphique du contenu en aclonifen dans les parties aériennes et les parties souterraines de moutarde blanche présentant soit des symptômes nécrotiques soit aucun symptôme. La dernière barre liée à chaque symptôme correspond à la concentration critique dans le sol ([C]s) calculée. b) Valeurs de A et T correspondants.

C) Conclusions :

A la fin de ce chapitre portant sur la recherche d'une sélectivité du colza vis-à-vis de l'aclonifen et l'évaluation des concentrations critiques atteintes par cet herbicide dans les zones cibles foliaires nous pouvons dire que les plantes utilisées n'ont pas toutes exactement les mêmes seuils de sensibilité mais que la zone de concentration à atteindre dans les feuilles pour avoir un effet létal est majoritairement située, en pré-levée, entre 10 et 130 μM .

Nous avons essayé de trouver un mode de représentation permettant de cerner l'origine de la sensibilité foliaire mesurée. En ce qui concerne la pénétration foliaire, les concentrations mesurées après un traitement de post-levée sont très fortes (310-470 μM) même si un doute existe sur la pénétration totale de l'aclonifen déposé sur les feuilles par pulvérisation. La situation des adventices utilisés est pratiquement la même que celle du colza : vulpin entre 160 et 350 μM , moutarde 130 à 310 μM . C'est le traitement de post levée qui charge le plus les feuilles et ces expériences ne laissent pas espérer une possibilité de traitement de post-levée avec l'aclonifen permettant de ne pas atteindre le colza.

La pré-levée a dans ce chapitre été abordée de deux façons : un traitement classique par pulvérisation (détruit le colza) et un traitement de pré-levée dit « homogène » car l'herbicide

est préparé pour contaminer de manière homogène le 1^{er} cm de sol, en installant les semences hors de la zone contaminée.

Les concentrations critiques foliaires mesurées suite au traitement classique de pré-levée sont de : 70 μM pour le colza, 75 μM pour la moutarde sauvage et 32 μM pour le vulpin. Avec le traitement homogène les concentrations atteintes suivants les symptômes sont situés entre 40 et 120 μM pour le colza, 40 et 110 μM pour le vulpin. La moutarde blanche qui a été utilisée dans ce dernier cas est atteinte de manière irréversible entre 10 et 20 μM .

L'hypothèse d'une possibilité de désherbage sélectif du colza par l'aclonifen apparait ainsi non fondée.

CHAPITRE VI

LA SELECTIVITE DU TOURNESOL (ET DU MAIS) VIS-A-VIS DE L'ACLONIFEN : UN EQUIPEMENT ENZYMATIQUE ADAPTE.

L'index ACTA (2010) nous indique que parmi les grandes cultures (exclusion faites des cultures maraîchères), le tournesol est pratiquement la seule culture en France traitée en prélevée avec le Challenge 600 à la dose de 2,7 kg d'aclonifen par hectare (Acta, 2010). Les travaux agronomiques ont démontré l'efficacité et la sélectivité de l'aclonifen dans la culture de Tournesol (Mircovich et Regnault, 1995 ; Fleury et Perez 1995). Ce constat suppose que, contrairement au comportement des autres plantes étudiées précédemment dans ce travail, le tournesol doit échapper à l'effet herbicide au traitement grâce à des mécanismes que nous allons tenter de mettre en évidence.

A) Matériel et méthodes :

1) Peut-on mettre en évidence des symptômes de «bleaching» et de nécroses chez le tournesol en présence d'aclonifen ?

Nous avons mis en œuvre 4 types de traitements à la dose agronomique (parfois comparés à la demi-dose) pour essayer de voir si, dans nos conditions expérimentales, les plantules de tournesol présentaient des symptômes de phytotoxicité vis-à-vis de l'aclonifen.

2) Comportement du tournesol suite à un traitement de prélevée « homogène ».

En reprenant la technique du traitement homogène de la couche supérieure (1 cm) du substrat utilisée à la fin du chapitre V, nous avons cultivé des plantules de tournesol dont les graines étaient positionnées à 3 cm de profondeur dans une zone non contaminée par l'herbicide. La culture se déroule sur 21 jours. La figure VI, 1 correspond à un montage photographique d'une plantule de tournesol en fin d'expérimentation.

Nos observations, en fin de culture, sur 15 individus montrent que les plantules ayant subi le traitement ne présentent ni symptômes de «bleaching» ni symptômes de nécrose. Il n'y a pas de différence de comportement, de croissance entre les plantes traitées et les témoins. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à ce niveau, 1) pour des raisons de composition cellulaire ou de structure anatomique, la zone de l'hypocotyle en contact avec la zone de sol traitée n'adsorbe et n'absorbe pas l'aclonifen, 2) la zone de contact sol-plante n'est pas capable d'assurer une

concentration critique au niveau foliaire (zone cible), 3) le tournesol dans ses parties souterraines et/ou aériennes est porteur d'activités de métabolisation faisant perdre à l'aclonifen son efficacité.

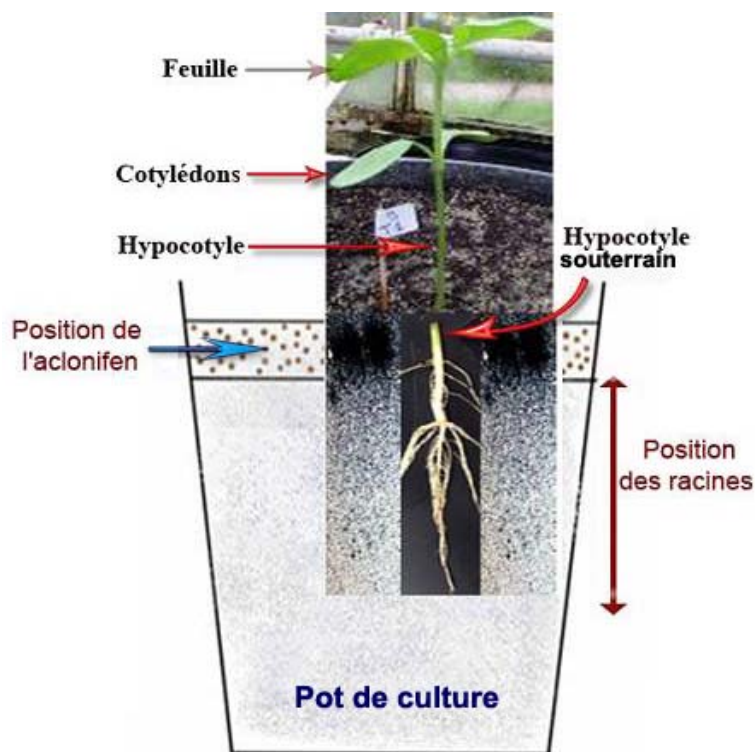


Figure VI, 1 : Photomontage représentant une plantule de tournesol de 21 jours cultivée en pot dans un mélange terre/terreau/sable en présence d'aclonifen appliqué de façon homogène à la dose agronomique dans une couche de 1 cm d'épaisseur. La zone de contact entre la plante et la zone contaminée (visualisée grâce à l'herbicide radioactif par la zone sombre de l'autoradiographie) est matérialisée par la zone de l'hypocotyle souterraine.

3) Comportement du tournesol suite à un traitement de pré-levée appliqué sur la totalité du substrat.

Dans l'expérience précédente seule la couche supérieure du substrat était contaminée et l'on peut supposer qu'une grande partie des organes souterrains échappait à la zone contenant l'herbicide. Dans cette deuxième expérience avec le tournesol, l'ensemble du substrat utilisé a été traité à la dose agronomique afin que les plantules soient en situation optimale de capture de l'aclonifen par les organes souterrains. Aucun symptôme de toxicité n'a été détecté à T21 jours.

4) Comportement du tournesol suite à un traitement de pré-levée réalisé au sein de toute la masse d'un substrat peu propice à bien retenir l'aclonifen : le sable de rivière.

Afin d'augmenter la disponibilité dans l'eau de l'aclonifen et de maintenir le maximum de surface de contact entre solution herbicide et parties souterraines de la plantule, nous avons réalisé un traitement de prélevée sur l'ensemble du substrat sable (demi-dose et dose agronomique). Ces conditions nous semblent être les plus favorables au chargement maximum de l'aclonifen dans les plantules en croissance (c'est pour cette raison qu'un essai à demi-dose a été réalisé). A T15 jours (après le semis) aucun symptôme de dépigmentation et/ou de nécrose des parties aériennes n'a été observé. Les mesures classiques de biométrie (longueur des organes, masses sèches, masses fraîches) ont été effectuées sans trouver de

différences entre plantes témoins et celles ayant subi le traitement. Seul un petit déficit dans les concentrations en pigments a été mesuré (figure VI, 2 et tableau VI, 1). Pour le traitement le plus fort (à la dose agronomique), le déficit de pigments est de 28,4% pour la chlorophylle a, de 31,5% pour la chlorophylle b, et de 28 % pour les caroténoïdes. Cette petite différence dans le contenu pigmentaire peut, peut être, s'expliquer par un début de blocage de biosynthèse des caroténoïdes et des chlorophylles sans que celui ci soit en situation d'affecter la croissance et de provoquer les symptômes classiquement observés avec l'aclonifen.

Tableau VI, 1 : Valeurs des teneurs en pigments (chlorophylles a et b, et caroténoïdes) dans les parties chlorophylliennes de feuilles de tournesol : Tem = témoins, dose = traité à la dose agronomique, et demi-dose = traité à la demi-dose agronomique. Situation à T15 jours après le traitement de tout le substrat sable. Valeurs exprimées en mg/g de masse fraîche. Nombre de réplicats 3 fois.

	Tem	Demi-dose	Dose
chl a	2,21 \pm 0,15	1,67 \pm 0,17	1,58 \pm 0,06
chl b	0,79 \pm 0,04	0,56 \pm 0,07	0,54 \pm 0,05
caroténoïdes	0,84 \pm 0,02	0,62 \pm 0,09	0,61 \pm 0,01

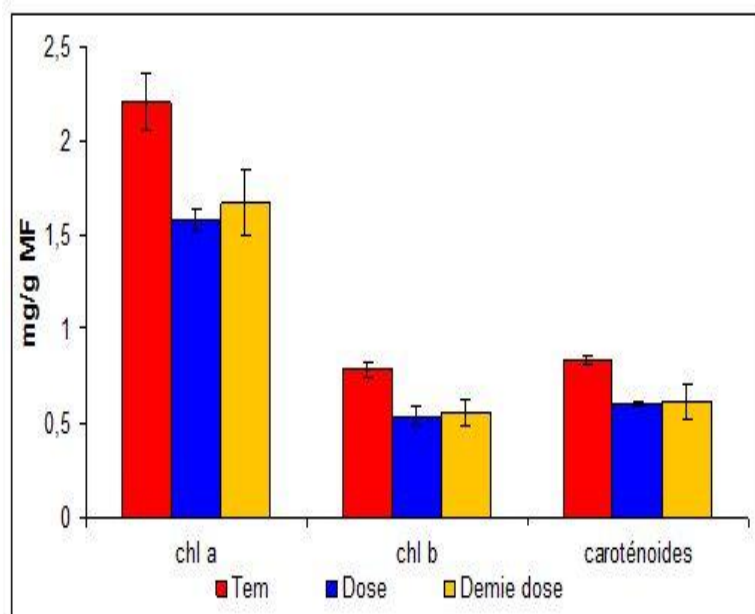


Figure VI, 2 : Variations des concentrations en pigments (chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes) dans les parties chlorophylliennes des plants de tournesol. Tem = témoin, dose = traitement à la dose agronomique, demi dose = traitement avec une demi-dose agronomique. Situation à T 15 jours après le semis et le traitement (pré-levée « homogène » sur le 1^{er} cm de substrat). Les résultats sont exprimés en mg/g de masse fraîche.

Lors de la récupération, en fin d'expérience, des plantes issues de l'expérimentation sur sable contaminé par Challenge 600 nous avons eu la surprise de constater que le chevelu racinaire des plants de tournesol (mais aussi de maïs cultivés en parallèle) était très clairement de couleur jaune (figure VI, 3), d'un jaune identique à celui de la molécule mère (le jaune des phénols nitrés). Notre hypothèse est que cet aclonifen à relativement forte dose n'a guère, dans le sable utilisé comme substrat, de possibilité de s'adsorber et que seul le chevelu

racinaire présente un substrat plus lipophile que l'eau ou le sable. La question se pose de la biodisponibilité de cette masse de produit positionné en surface de la plante, ou s'il y a chez le tournesol une barrière à la pénétration qui n'existe pas chez les plantes précédemment étudiées.



Figure VI, 3 : Comparaison du chevelu racinaire de plantes témoins et traitées à l'aclonifen. La couleur jaune sur les racines des plantes traitées correspond à la matière active qui s'accumule à partir du traitement d'un substrat uniquement formé de sable. Expérience sur tournesol et maïs cultivés 21 jours sur substrat sable totalement contaminé à la dose agronomique.

5) Comportement du tournesol suite à un traitement de post-levée réalisé avec Challenge 600 utilisé à la dose agronomique.

Cette expérience effectuée au départ pour évaluer la symptomatologie liée à un traitement foliaire a été réalisée sans traceur radioactif, ce qui nous interdit toute mesure de concentration interne dans les organes contaminés par l'herbicide. Le traitement de post-levée a lieu à T20 jours sur des plantes au stade 1^{ère} paire de feuilles, les cotylédons sont bien développés et chlorophylliens. L'évaluation des symptômes est effectuée à T28 jours après le semis. La plante est alors au stade 1^{ère} paire de feuille, la 2^{ème} paire émerge franchement. Aucun des paramètres suivis en comparaison témoins et plantes traitées n'a bougé : masse fraîche, masse sèche, teneurs en pigments, taille des organes. Cet essai de traitement agronomique en post-levée sur plantules de tournesol se résume de la façon suivante : nous n'avons détecté aucun symptôme de phytotoxicité occasionné par l'emploi du Challenge 600 à la dose de 2,7 kg/ha.

6) Comportement du tournesol suite à un chargement par infiltration sous vide de l'aclonifen de feuilles excisées.

Des résultats obtenus plus haut (chapitre III) portant sur la pénétration transcuticulaire de l'aclonifen appliqué avec demi-dose et dose agronomique (formulation Challenge 600) nous ont montré que cette pénétration n'est pas massive (voir figure III, 20), ce qui peut expliquer

le manque d'effet par défaut de pénétration dans la feuille. Pour contourner cette difficulté possible de pénétration, nous avons infiltré sous vide des préparations d'aclonifen dans les feuilles. Sous vide nous avons fait rentrer l'herbicide par le pétiole de feuilles séparées des plants. La différence de poids de la feuille avant et après traitement correspond à la masse de liquide (ou son volume) qui est rentré. Ce volume proche de 30% du volume foliaire correspond à la partie atmosphérique naturelle de l'intérieur de la feuille : méats, chambres sous-stomatiques... Malgré une entrée maximale d'aclonifen au niveau de l'organe cible, aucun symptôme n'est apparu durant les 4 jours d'expérimentation en pleine lumière. Celle-ci n'a pu être poussée plus loin, des signes de dégradation des feuilles en survie commençant à apparaître sur les échantillons sélectionnés, témoins compris.

Ainsi, après recherche des effets du traitement de pré-levée situé sur le 1^{er} cm de sol, celui sur toute la hauteur du sol, celui sur du sable retenant mal la matière active, celui du traitement de post-levée, et celui en post-levée après infiltration : **la conclusion qui s'impose est que l'aclonifen appliqué à la dose agronomique sur tournesol en pré- ou en post-levée ne déclenche aucun des symptômes classiquement liés à l'emploi de cet herbicide c'est à dire ni dépigmentation foliaire ni nécroses à la lumière.**

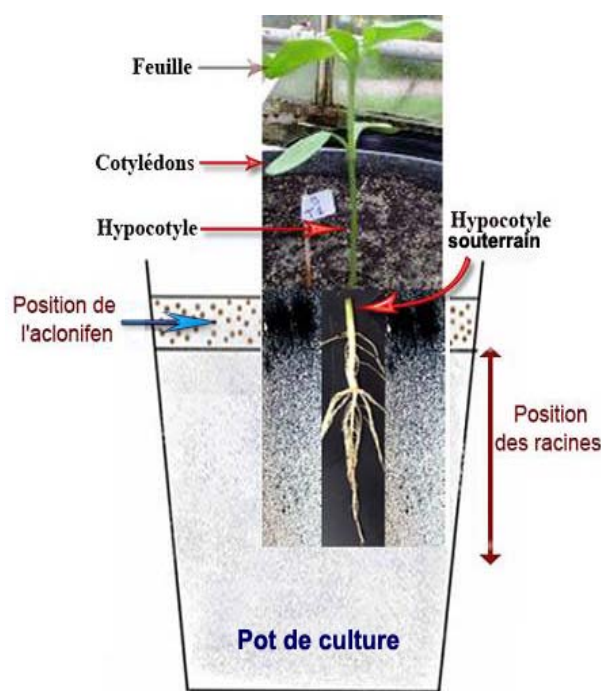
B) Résultats :

1) Présence de l'aclonifen dans les différents organes du tournesol suite aux différents traitements effectués ci-dessus

A part dans l'expérimentation d'infiltration où l'on est sûr que l'aclonifen est à l'intérieur de la zone cible, dans les autres expériences décrites ci-dessus nous avons cherché à quantifier la présence de l'herbicide dans les espaces internes des plantules ayant subi les divers traitements.

1a) Répartition de l'aclonifen dans une plantule de tournesol ayant subi un traitement de pré-levée « homogène ».

Les résultats des comptages présentés (figures VI, 4 et 5) correspondent aux concentrations (en nmoles/g de masse fraîche = μM) dans les différents organes de plantules de tournesol (moyenne obtenue avec 6 échantillons). Les résultats montrent 1) que le produit pénètre, 2) que le produit circule vers le haut (cotylédons – feuilles), vers le bas (racines), et, 3) que les concentrations mesurées sont diverses (de 26 μM dans la partie de l'hypocotyle en contact avec le substrat traité à 1 μM dans la feuille). Traduits en %, ces résultats montrent que l'essentiel de ce qui a pénétré dans la plante est présent dans la zone d'entrée (hypocotyle souterrain avec 72% de la quantité introduite).



Organes	Concentration (μM)	%
Feuilles	$0,9 \pm 0,8$	$2,7 \pm 2,2$
Cotylédons	$2,1 \pm 0,9$	$5,6 \pm 2,5$
Hypocotyle aérienne	$2,6 \pm 2,4$	$7,3 \pm 6,6$
Hypocotyle souterrain	$26,2 \pm 13,8$	$72,6 \pm 38,2$
Racines	$4,3 \pm 2,1$	$12 \pm 5,8$

Figure VI, 4 : Concentrations (μM) et pourcentages en aclonifen dans les différents compartiments de la plantule de tournesol traitée en pré-levée « homogène » à la dose homologuée de 2,7 kg/ha. Situation à T 21 jours après le semis et le traitement. Chaque valeur présente la moyenne \pm écartype de 6 échantillons.

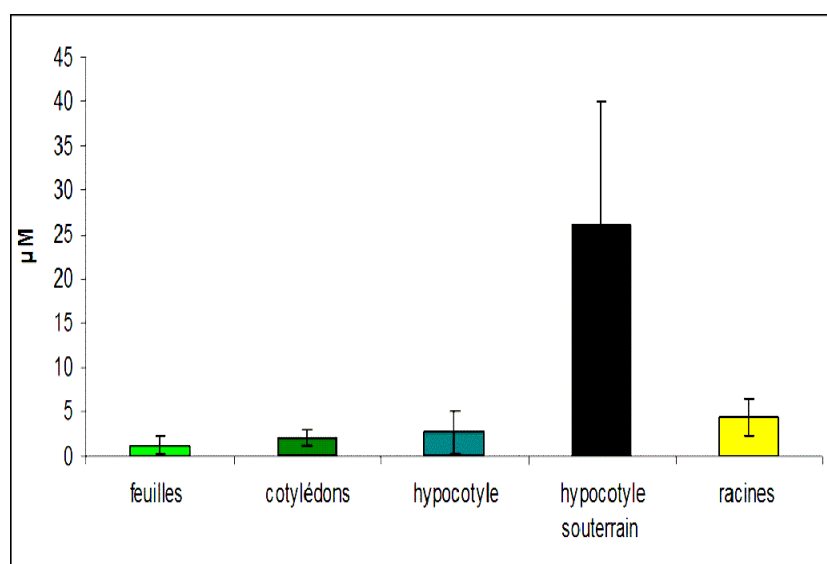


Figure VI, 5 : Concentrations en aclonifen organe par organe chez des plantules de tournesol soumises à un traitement de pré-levée « homogène ». Résultats obtenus à T 21 jours. Les résultats sont exprimés en μM . Moyenne sur 6 échantillons.

Cette expérimentation démontre que, lors d'un traitement de prélevée, des parties souterraines jeunes autres que le système racinaire sont en situation d'adsorber et d'absorber l'aclonifen. Dans le cas étudié, la pénétration par cet organe (l'hypocotyle souterrain) conduit à des concentrations internes comprises entre 1 et 22 μM (à ces concentrations dans les feuilles il n'y a pas ou peu de symptômes pour les plantes utilisées au chapitre précédent). Les parties

aériennes (partie de l'hypocotyle à la lumière, cotylédons, feuilles) peuvent être contaminées par le flux xylémien. Se pose alors la question du chargement du bois à partir des cellules parenchymateuses de l'hypocotyle souterrain.

Le chargement racinaire peut avoir deux origines : un chargement de cellule à cellule par simple partition et diffusion ou, plus compliqué et peu crédible, un chargement phoémien de l'aclonifen qui, arrivé au niveau des feuilles, suit une systémie phloémienne descendante vers les apex des racines.

1b) Comparaison de la pénétration de l'aclonifen dans des plantules de tournesol traitées en pré-levée soit « homogène » soit, dans un substrat identique en composition, complètement contaminé.

Les résultats de la comparaison des concentrations en aclonifen, organe par organe, entre ces deux types de traitement de pré-levée (« homogène » et total) sont présentés figure VI, 6.

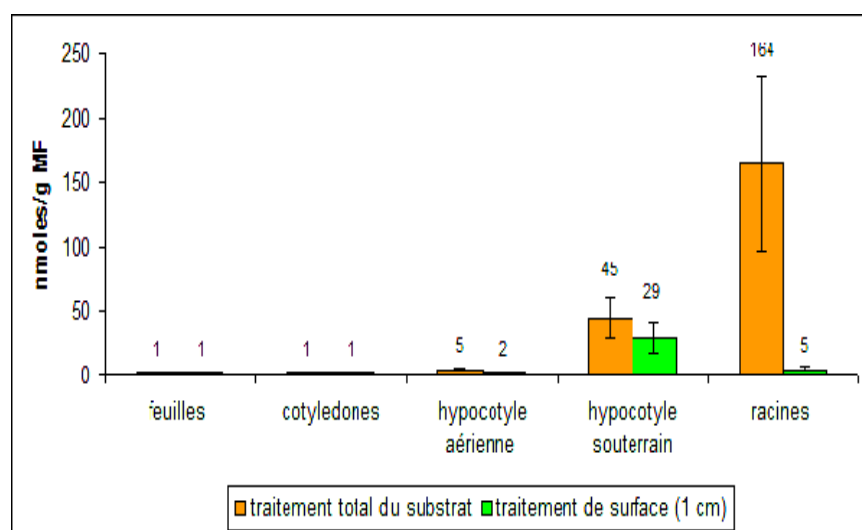


Figure VI, 6 : Comparaison des concentrations internes en aclonifen obtenues lors de deux types de traitement de pré-levée (soit traitement de la couche supérieure du sol soit traitement de tout le substrat). Résultats obtenus sur des plantules de tournesol à 21 jours.

Les résultats obtenus avec le traitement de surface (parties droites des histogrammes) représentent une répétition de l'expérience précédente et apporte les mêmes résultats que ceux présentés figures VI, 4 et 5. Les résultats obtenus au même instant lors d'un traitement de tout le substrat contenu dans le pot de culture correspondent à la partie gauche des histogrammes. La répartition de l'aclonifen dans l'expérience « traitement de tout le substrat » est la suivante : 79% dans les racines (contre 12% dans l'autre expérimentation), 18% dans la partie souterraine de l'hypocotyle (contre 72%) et 3% dans l'ensemble des parties aériennes (contre 6%).

Il est clair qu'en augmentant les surfaces de contact entre la matière active et le système souterrain des plantes, la pénétration de l'herbicide est augmentée. A la même date de culture

(T 21 jours), une culture de tournesol soumise à un traitement total du substrat contient 36,3 nmoles par individu (moyenne sur 6), tandis que les tournesols soumis au traitement appliqué de manière homogène sur 1 cm d'épaisseur, contiennent 4 nmoles/individu (moyenne sur 6 échantillons) soit 9 fois moins que pour le traitement répartis dans tout le substrat. Par contre cette augmentation ne se traduit apparemment pas par une augmentation de la concentration dans l'espace cible, c'est-à-dire les feuilles. L'origine de ce fait pourrait être une absence de transpiration mais aussi une ségrégation de métabolites.

1c) L'utilisation d'un substrat peu adsorbant (le sable) pour l'aclonifen change t'elle quelque chose aux concentrations internes des organes de tournesol?

Craignant une biodisponibilité pour les plantules (et donc une toxicité) très forte de l'aclonifen associé au substrat sable, nous avons choisi à priori, de coupler notre essai sable totalement contaminé par une dose agronomique à un essai demi-dose (en cas de destruction complète des tournesols avec la dose homologuée). Cette situation ne s'est pas produite et c'est, lors du prélèvement des plantules (à T 21 jours après le semis et le traitement), aux deux doses utilisées, que nous avons constaté la couleur jaune de l'ensemble racinaire. Cette situation a été observée avec le maïs aussi (analysé plus loin dans ce chapitre).

Les résultats portant sur la répartition de l'aclonifen entre les organes des plantules de tournesols sont présentés tableau VI, 2 et figure VI, 7.

Tableau VI, 2 : Répartition (en %) de l'aclonifen associé aux différents organes des plantules de tournesol soumises pendant 21 jours à un traitement total ou demi-dose appliquée dans la totalité du substrat sable. Le résultat « total racine » correspond à la somme de ce qui est retrouvé dans un lavage rapide à l'éthanol/eau et à la partie « dans racines » qui a réellement pénétré dans l'organe.

	1/2 dose	dose
feuilles	0,17	0,13
épicotyle	0,37	0,29
cotylédons	2,56	1,6
hypocotyle	4,59	3,25
dans racines	14,88	12,71
lavage racine	62,55	69,32
total racine	77,43	82,03

Les résultats présentés montrent une très forte contamination des racines (2,4 μ moles/g de masse fraîche à la dose agronomique et 1,4 μ mole/g de masse fraîche à la demi-dose). Cette situation est observée à 21 jours alors que le sable est contaminé dans son intégralité. Intrigué par la couleur jaune des racines lors du démontage de l'expérimentation et de la forte adsorption sur ces organes nous avons tenté un rinçage instantané des racines (renouvelé 5 fois) dans un mélange éthanol/eau (1/1 ; v/v) pour différencier l'aclonifen adsorbé sur les racines de celui absorbé par les racines (et inextractible par un lavage rapide au solvant). La

situation est claire : à 21 jours de culture sur sable contaminé ce qui est adsorbé aux racines mais non pénétré est majoritaire (80% de ce qui est associé aux racines pour la demi-dose et 83% pour la dose totale).

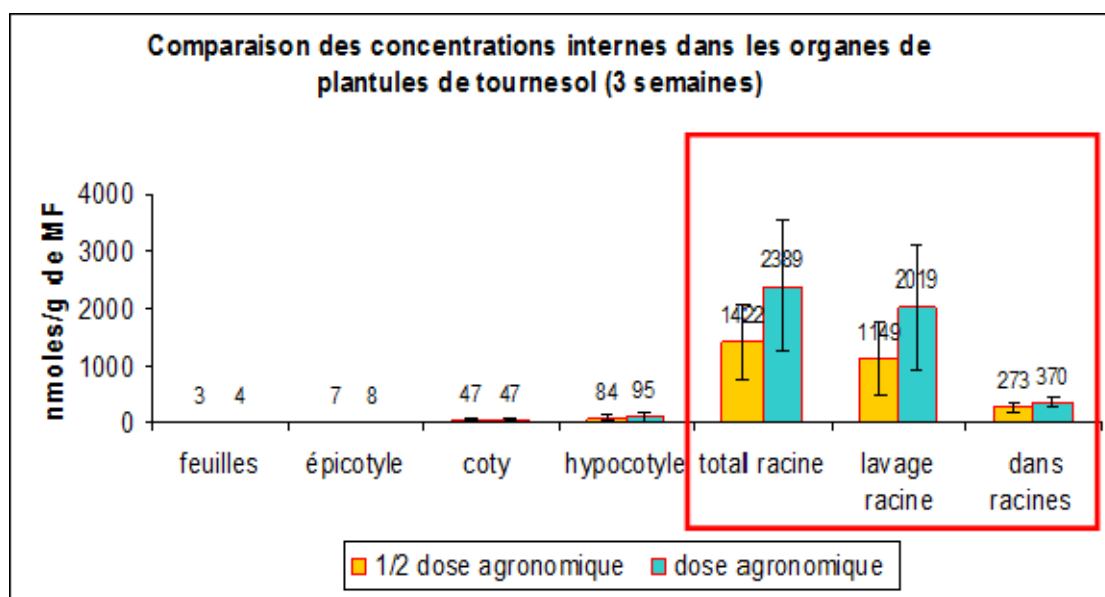


Figure VI, 7 : Histogrammes de répartition de l'aclonifen dans les organes de plantules de tournesol de 21 jours soumises à un traitement herbicide de pré-levée appliqué dans un substrat sable aux doses agronomique ou demi-dose. Les résultats sont exprimés en nmoles/g de MF équivalant à des concentrations μM .

Si l'on considère maintenant ce qui est réellement à l'intérieur des plantules, les parties aériennes (contenant la zone cible) sont faiblement chargées : environ 30% avec chaque traitement. Parmi les parties aériennes, l'hypocotyle est le plus chargé (80-90 μM suivant le traitement, les cotylédons sont à 47 μM , l'épicotyle à 7-8 μM , les feuilles (organe cible) entre 3 et 4 μM , ce qui est très loin des concentrations critiques évaluées sur colza et adventices (chapitre V). Ainsi, les parties aériennes sont-elles faiblement chargées en aclonifen en comparaison de ce qui a réellement pénétré dans les racines (270 à 370 μM suivant la dose de traitement). Le transfert xylémien de l'aclonifen paraît faible pour 3 semaines de culture, une transformation métabolique suivie d'une possible séquestration racinaire pourrait expliquer cette situation. Une très forte adsorption pariétale pourrait aussi être envisagée.

2) La situation du maïs vis-à-vis de l'aclonifen appliqué dans la totalité du substrat à la dose agronomique. Comparaison avec la situation du tournesol.

Certains pays européens comme l'Italie et l'Espagne ont autorisé l'aclonifen en culture de maïs à la dose de 1kg/ha. Nous avons montré par des études de laboratoire que le maïs dans certaines conditions expérimentales était sensible à l'aclonifen et présentait les symptômes classiques liés à cet herbicide à savoir : dépigmentation et nécroses. Cependant nous avons

noté que la sensibilité de cette espèce végétale ne semblait pas très forte (située entre la sensibilité forte du colza et l'insensibilité du tournesol). Nous avons recherché les raisons de cette sensibilité intermédiaire qui fait que la dose agronomique sur maïs n'est pas de 2,7 kg/ha mais seulement de 1 kg/ha. Les essais qui vont être décrits vont être effectués volontairement à 2,7 kg/ha. soit 20 mg d'aclonifen par pot de culture.

2a) Situation des plantules de maïs cultivées 21 jours sur un mélange terre/terreau/sable complètement contaminé en pré-levée par de l'aclonifen appliqué à la dose de 2,7 kg/ha.

Du point de vue des symptômes nous avons observé en fin de 1^{ère} semaine (T7 j) une dépigmentation de la partie inférieure de la 1^{ère} et seule feuille formée à ce stade. A T21 j. cette décoloration s'est estompée, les 3 autres feuilles formées sont identiques à celles des témoins. La culture qui semble à peu près normale est arrêtée et les concentrations internes organe par organe sont déterminées grâce à la radioactivité (figure VI, 8).

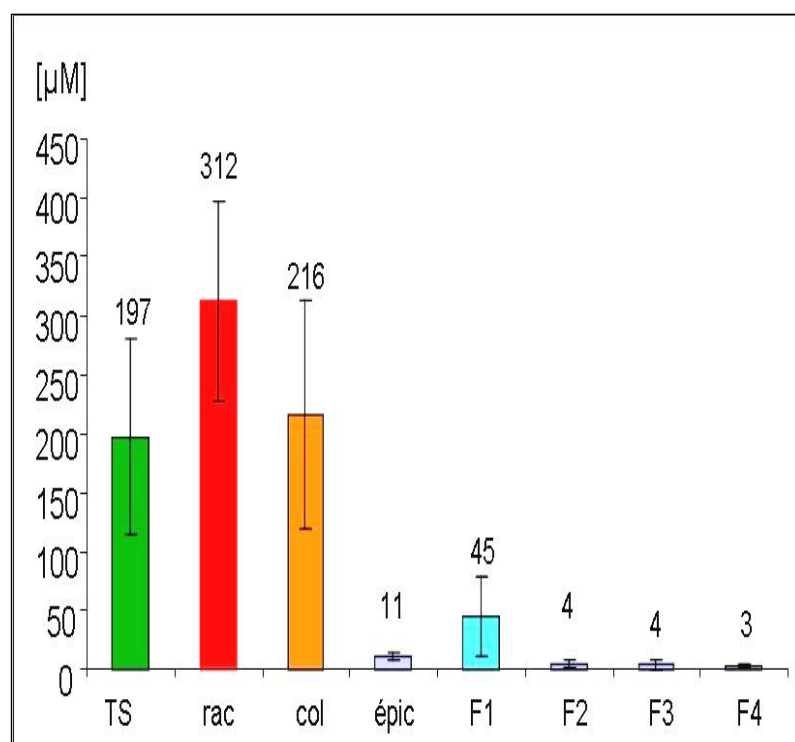


Figure VI, 8 : Concentrations (en μM) dans différents organes issus de plantules de maïs de 21 jours et cultivées sur un mélange terre/terreau/sable totalement contaminé par de l'aclonifen appliqué en pré-levée à la dose de 2,7 kg/ha. Moyenne de 10 échantillons. TS = téguments de la semence, rac = racines + épicotyle souterrain, col = totalité du coléoptile, épïc = partie aérienne de l'épicotyle, F1, F2, F3 et F4 = feuilles numérotées par ordre d'apparition

La figure VI, 8 indique très clairement que la contamination est majoritaire dans les parties souterraines (91% de la quantité pénétrée). Une concentration forte est retrouvée dans les téguments du caryopse, la nature lipophile de ces téguments explique cela. Les racines accumulent une très forte concentration (plus de 300 μM) en herbicide sans conséquences pour l'abondance du chevelu racinaire. Dans les mêmes conditions expérimentales les racines de tournesol étaient à 164 μM (figure VI, 6). Le coléoptile dont la partie basale est en contact

avec le substrat contaminé apparaît aussi contaminé que les téguments, la partie aériennes perdant de l'eau chargée en herbicide doit aussi participer au chargement de cet organe.

Pour les parties aériennes (feuilles) dont le chargement se fait sans contact avec le substrat la situation est très variable suivant la position des feuilles. On obtient 45 μM dans la première feuille. L'ordre de grandeur des concentrations critiques dans les zones cibles des plantes sensibles étudiées au chapitre précédent était dans une fourchette de 40 à 70 μM . Cette valeur de 45 μM dans la 1^{ère} feuille qui seule présente des symptômes correspond probablement à la concentration minimale déclenchant des symptômes de phytotoxicité chez le maïs. Pour une même condition expérimentale, les feuilles de tournesol présentaient une concentration de 1 μM dans les feuilles. Ainsi, la plantule de maïs apparaît plus sensible à l'aclonifen que le tournesol.

2b) Situation des plantules de maïs cultivées 21 jours sur un substrat sable complètement contaminé en pré-levée par de l'aclonifen appliqué à la dose de 2,7 kg/ha.

Avec un tel substrat la biodisponibilité de l'aclonifen est maximale et, à 21 jours de culture, les symptômes sur plantules de maïs sont plus marqués que dans la situation précédente. La dépigmentation marque très nettement la moitié inférieure des feuilles 1 et 2 et la base des feuilles 3 et 4. Les extrémités des feuilles 1 et 2 sont nécrosées.

A la fin de l'expérience les plantes sont extraites des substrats et préparées par organe pour les dosages. La comparaison avec les témoins (figure VI, 9) indique qu'après traitement une baisse de croissance est sensible (30% sur la masse fraîche des feuilles et 42% sur la masse fraîche des racines). Cette différence de croissance mesurée à T 21 j est encore valable à T 35 j (37% sur les parties aériennes et 32% sur les racines). Cette diminution en masse des feuilles et des racines se retrouve sur l'élongation de ces organes (30% sur les feuilles 44% sur les racines). Au niveau des racines nous observons là aussi le dépôt de couleur jaune sur le chevelu racinaire déjà mentionné plus haut (figure VI, 3). Ces différences de croissance foliaire et racinaire qui viennent d'être soulignées n'existent pas chez le tournesol (comparaison des résultats obtenus pour les deux plantes présentée figure VI, 9). Ainsi, avec les symptômes observés chez le maïs uniquement dans la pire situation expérimentale, on peut dire que cette culture tolère l'aclonifen si certaines limites de concentration dans le substrat ne sont pas dépassées, tandis que le tournesol dans les mêmes conditions expérimentales ne présente aucun symptôme de phytotoxicité. Ainsi nous pouvons dire que le tournesol tolère très nettement plus l'aclonifen que le maïs.

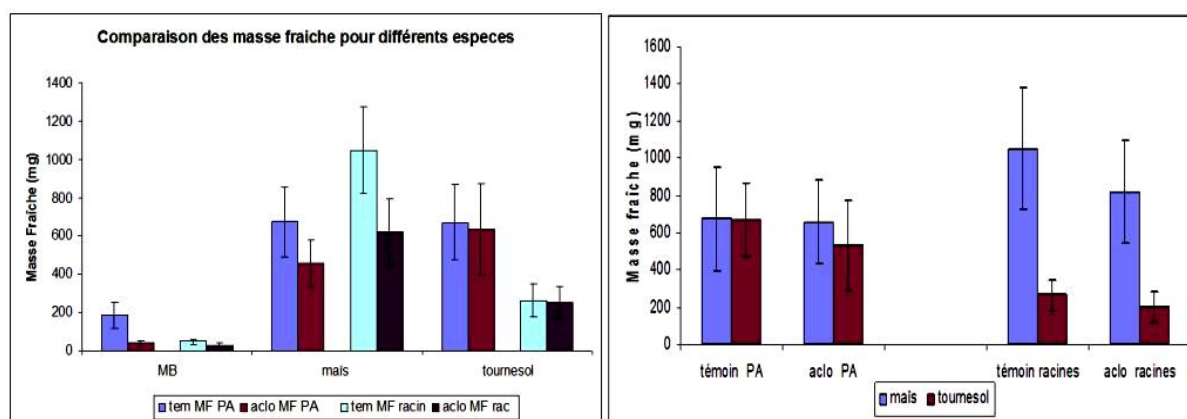


Figure VI, 9 : Effet de l'aclonifen appliqué en pré-levée dans la totalité du substrat sable à la dose agronomique sur la masse fraîche de plantules de maïs et tournesol (à T 21 j). Sont présentées les masses fraîches des parties aériennes : témoin et essai (aclo) et celles des racines. Moyenne de 25 échantillons.

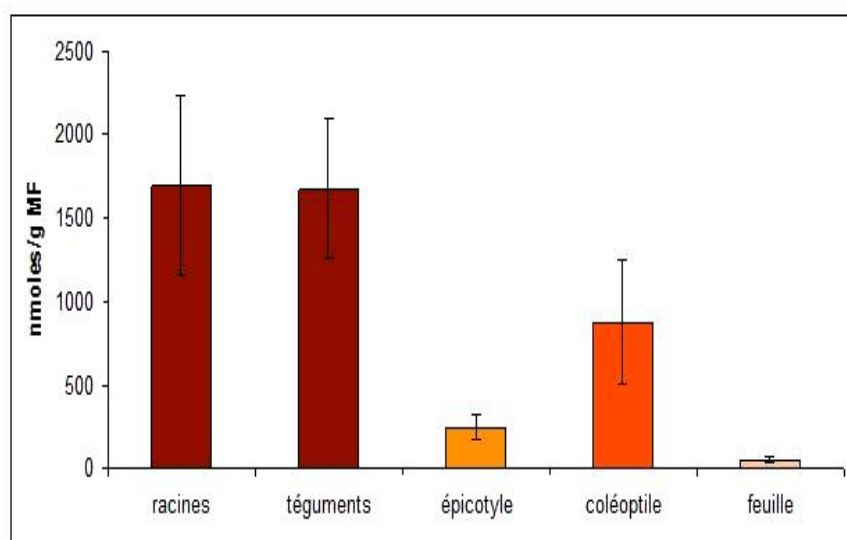


Figure VI, 10 : Concentrations (en nmoles/g de masse fraîche ou µM) dans différents organes issus de plantules de maïs de 21 jours et cultivées sur sable totalement contaminé par de l'aclonifen appliqué en pré-levée à la dose de 2,7 kg/ha. Moyenne de 6 échantillons.

Tableau VI, 3 : Concentrations (en nmoles/g de masse fraîche ou µM) dans différents organes issus de plantules de maïs de 21 jours et cultivées sur sable totalement contaminé par de l'aclonifen appliqué en pré-levée à la dose de 2,7 kg/ha. Moyenne de 6 échantillons.

organes	racines	téguments	épicotyle	coléoptile	feuille
concentration (nmoles/g MF)	1691 ± 544	1676 ± 416	246 ± 71	876 ± 370	49,7 ± 18

Les résultats rapportés figure VI, 10 montrent une contamination très forte des organes souterrains (racines, restes des téguments de la semence, épicotyle). La majorité du coléoptile est elle aussi souterraine et fortement marquée par l'herbicide (876 ± 370 nmoles/g de MF). La partie feuille est nettement moins importante indiquant une difficulté de migration de la matière active vers les organes cible de l'aclonifen et siège de la transpiration (moteur du mouvement). Cependant la concentration interne foliaire voisine de 50 µM est très proche des

concentrations critiques trouvées pour les feuilles des plantes sensibles. Les quantités d'aclonifen associées aux téguments de la semence et au coléoptile ne sont guère en situation d'échanger avec l'espace aérien par contre les 1700 nmoles/g de MF de racine doivent pouvoir être échangés avec la feuille. Ce transfert ne semble pas si facile compte tenu du différentiel de concentration entre ces deux espaces. A moins que l'essentiel de l'aclonifen racinaire soit adsorbé à l'extérieur des racines donc non accessible pour un transfert xylémien. La concentration racinaire du maïs est cependant inférieure à celle mesurée dans les mêmes conditions expérimentales sur tournesol (2400 nmoles/g de masse fraîche, figure VI, 7). Dans cette dernière situation le transfert racines-espace foliaire est encore plus problématique, la concentration foliaire à 21 jours n'étant que de 4 nmoles/g de MF.

2c) Evolution du stock adsorbé sur les racines de tournesol et de maïs.

Nous avons indiqué qu'à T 21 j dans les conditions d'un sable traité à la dose agronomique une part importante de l'aclonifen associé aux racines n'était pas à l'intérieur de la plante. Cette situation est-elle figée ou transitoire ?

A 21 jours, les concentrations racinaires étaient, pour les racines de tournesol de 2400 nmoles/g de masse fraîche réparties en 2000 nmoles/g de MF à l'extérieur et 370 nmoles/g de MF, à l'intérieur (soit une pénétration de 15% de la matière active associée aux racines, figure VI, 7).

Dans la même situation expérimentale, les résultats obtenus avec le maïs âgé de trois semaines la concentration interne mesurée sur l'ensemble racinaire est de 1700 nmoles/g de masse fraîche, avec 590 à l'intérieur et 1100 à l'extérieur (soit une pénétration d'environ 1/3). Deux semaines plus tard (T 35 jours) une nouvelle évaluation du contenu racinaire est effectuée pour le tournesol et le maïs (figure VI, 11). La concentration racinaire globale a encore augmenté, elle passe, par exemple pour les racines de tournesol, de 2400 à 4200 nmoles/g de masse fraîche. Durant le laps de temps qui sépare les deux mesures l'ordre de répartition dans la racine s'est inversé, la part d'aclonifen dans les racines de tournesol a très fortement progressé (84% de l'aclonifen se retrouvent à l'intérieur de l'organe). 16 % sont encore à l'extérieur.

Dans le cas du maïs (T 35 j), le stock racinaire a plus que doublé, la partie ayant pénétré est majoritaire (87%), ne restent à l'extérieur que 13% adsorbés sur les systèmes racinaires.

Le comportement du système racinaire, qu'il soit de maïs ou de tournesol est le même : au cours du développement racinaire sur un substrat peu absorbant (sable) vis-à-vis de l'aclonifen, les racines en croissance ouvrent un espace suffisamment lipophile dans le

système pour qu'elles adsorbent sous forme précipitée (visible à l'œil) de grandes quantités de produit. A partir de ce dépôt, suivant les règles de partition/diffusion, l'herbicide rejoint l'espace racinaire interne. Ensuite, lentement le système foliaire se chargera pour atteindre ou non la concentration critique. A T 35 j ces concentrations mesurées sont de 50 μM pour les feuilles de maïs (avec des signes de phytotoxicité) et 23 μM pour le tournesol sans aucun symptôme (figure VI, 11).

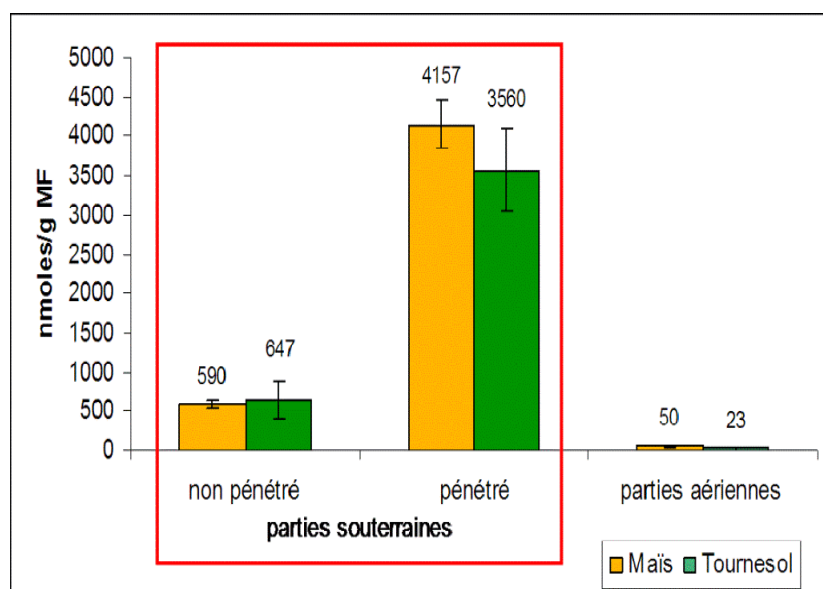


Figure VI, 11 : Comparaison des concentrations mesurées dans les racines et les parties aériennes de maïs et de tournesol cultivés 5 semaines (T 35 j) sur sable contaminé de manière homogène par de l'aclonifen utilisé à la dose agronomique.

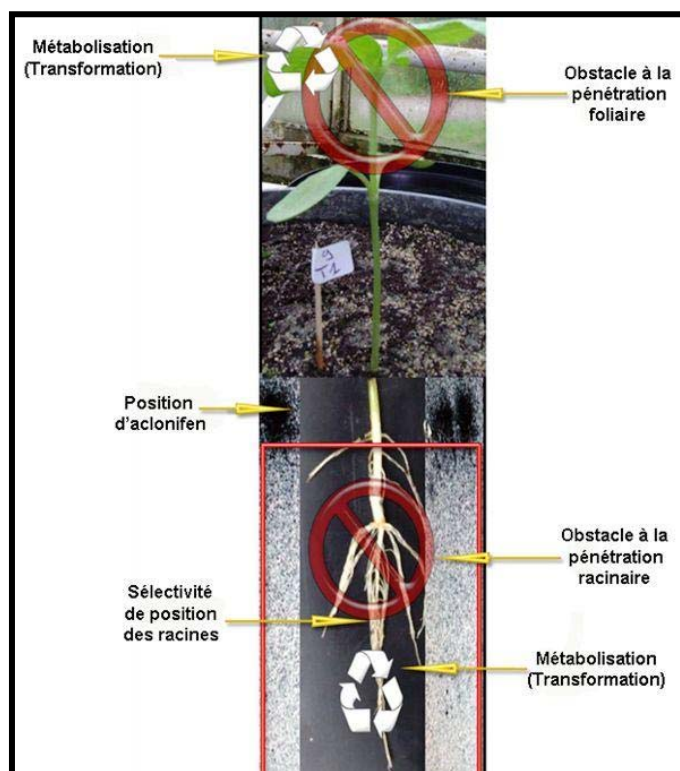


Figure VI, 12 : Possibilités de mécanismes expliquant la sélectivité du tournesol à l'état de plantule vis-à-vis de l'herbicide aclonifen utilisé aussi bien en pré-levée que post-levée.

A l'issue de cette étude portant pour l'essentiel sur le tournesol, il est clair que cette espèce végétale se comporte de manière atypique vis-à-vis de l'aclonifen. Nous avons vu que le maïs lui aussi était capable de tolérer cet herbicide mais certains signes montrent que la marge de sélectivité de cette plante est plus limitée que celle du tournesol. La figure VI, 12 tente de

résumer les raisons pour lesquelles le tournesol (et peut être le maïs) est en situation de contrôler l'action toxique de l'aclonifen. Ces possibilités sont multiples, que le traitement soit

effectué en post-levée (on sait que la formulation Challenge 600 n'est pas défavorable à une pénétration foliaire), ou en prélevée.

En pré-levée, on peut imaginer une sélectivité de position en évitant aux parties souterraines un contact trop important avec la zone contaminée. On a démontré que les hypocotyles souterrains étaient en situation d'assurer un flux de produit suffisant pour tuer les plantes sensibles. Il semble que cette voie de sélectivité, malgré le fait que le tournesol fasse rapidement une racine pivot hors de la zone traitée, ne soit pas l'explication pour cette culture. La structure même de la racine pourrait être une barrière à la pénétration. L'étude des contenus racinaires avec une partie de l'herbicide adsorbée et l'autre absorbée, montre que la racine de tournesol n'est pas un obstacle à la pénétration de l'aclonifen même si celle-ci n'apparaît pas fulgurante.

Reste au niveau racinaire la possibilité d'une métabolisation de l'aclonifen. Si cette métabolisation existe elle doit se voir dans nos expérimentations en particulier celles réalisées avec l'aclonifen radioactif. Les molécules dont nous avons mesuré la teneur dans les différents organes étaient peut être la molécule mère et peut être des métabolites ayant perdu leur activité herbicide mais pas leur carbones radioactifs. Par phytochimie, chromatographie, autoradiographie, nous allons étudier cette possibilité de transformation de la matière active.

En post-levée, nous avons démontré le passage transcuticulaire de l'aclonifen contenu dans sa formulation Challenge 600. Dans ce cas, il n'existe plus qu'une possibilité de tolérance : la métabolisation foliaire qui sera étudiée avec les mêmes moyens que la métabolisation racinaire.

3) Présence de métabolites de l'aclonifen dans les organes souterrains de plantules de tournesol et de maïs traités en pré-levée.

Une des possibilités d'échapper à un traitement herbicide souvent exprimée dans des cultures concerne une faculté de résistance par transformation métabolique : la culture transforme la matière active avant son arrivée sur le site biochimique induisant la perte de l'effet. Cet effet est recherché dans le cas de grandes cultures mais il peut être subi quand ce sont des adventices qui portent de telles activités de détoxification. Dans les cas qui nous occupent, les résultats obtenus vont dans le sens d'une résistance à l'aclonifen chez le maïs et le tournesol, par transformation de la matière active en métabolites inactifs.

3a) Visualisation de métabolites de l'aclonifen dans les deux cultures choisies.

Pour introduire le maximum d'aclonifen dans les parties racinaires de nos plantes, nous avons choisi les conditions optimales de chargement parmi celles que nous avons mis en œuvre précédemment, à savoir, des cultures de 5 semaines sur sable totalement contaminé à la dose

agronomique. Au temps T 35 j, les plantes sont débarrassées de leur substrat, les racines sont lavées pour enlever la partie d'aclonifen adsorbée sur elles. Les racines sont pesées puis broyées en présence de méthanol. L'extrait méthanolique est centrifugé, concentré sous vide. Une première analyse chromatographique de cet extrait est réalisée (figure VI, 13) et quantifiée grâce au Phosphorimager.

L'analyse brute des résultats fournis par la figure VI, 13 indique la présence chez le maïs de 4 produits (au moins) dérivés de l'aclonifen introduit dans l'expérimentation. Cela n'exclut pas la possibilité d'avoir deux produits l'un sur l'autre. Dans le système chromatographique choisi ces 4 produits ont respectivement des R_f de 0, 0,2, 0,8 et 0,9 et leur quantification, dans l'ordre des R_f , est la suivante 11,3%, 8,6%, 10,2%, et 69,9%. Ainsi, le produit majoritaire pourrait être l'aclonifen non encore transformé. Les trois molécules à R_f plus faibles que celui de l'aclonifen indiquent des changements de polarité des molécules transformées avec une apparition (pour 11,3% de l'ensemble) d'une ou de molécules qui ne migrent absolument pas avec le solvant utilisé (comme le font des molécules devenues très polaires par conjugaison à des sucres ou des acides aminés).

La situation obtenue avec l'extrait méthanolique de racines de tournesol ressemble qualitativement à celle vue pour le maïs sans pour autant indiquer une similitude de métabolites dans les deux espèces. La quantification de l'extrait donne en partant des R_f forts : spot 1, 17,5% ($R_f = 0,9$), spot 2, 43,3%, ($R_f = 0,2$), spot 3 : 35,6% ($R_f = 0$), spot 4 : 3,8%, ($R_f = 0$). Le lecteur d'intensité de radioactivité détecte 2 spots à R_f proche de 0.

Dans le cas du tournesol, la molécule à R_f fort correspondant à celui de l'aclonifen (peut être l'aclonifen) est moins bien représentée (17,5%) que chez le maïs (69,9%), ce qui tendrait à signifier que le tournesol métaboliserait plus facilement et plus rapidement l'aclonifen que le maïs.

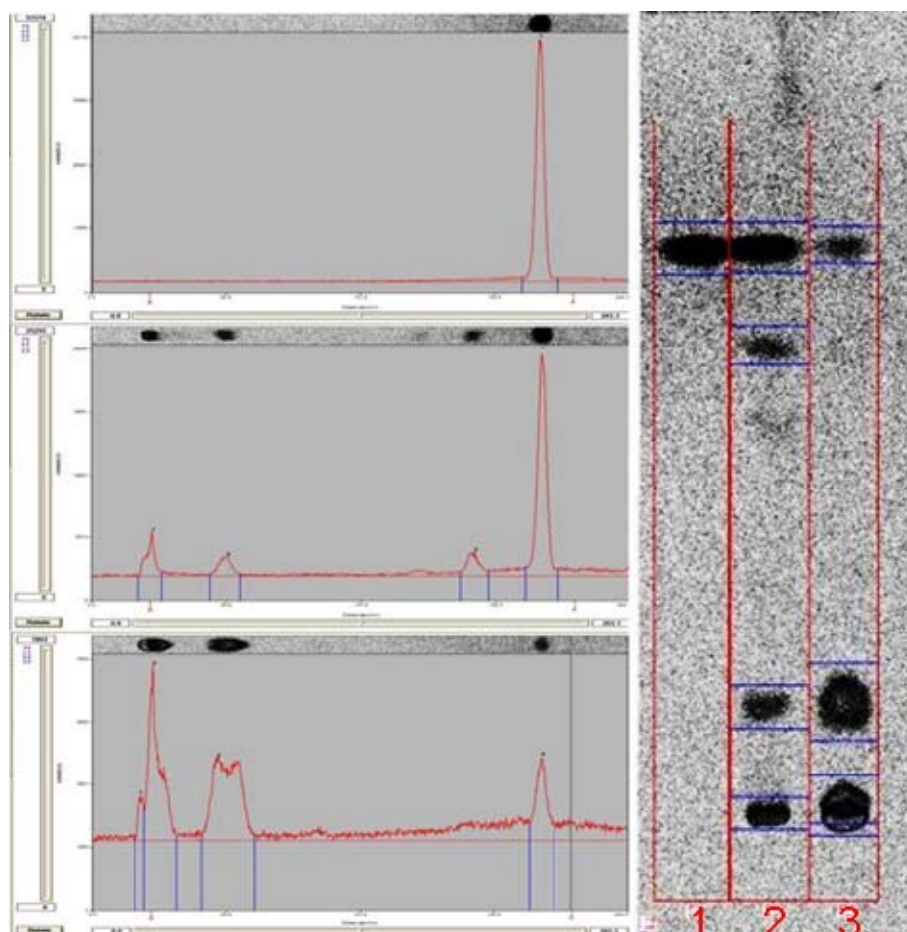


Figure VI, 13 : Autoradiographie d'un chromatogramme réalisé sur plaque de silice avec un solvant correspondant à un mélange éther de pétrole, dichloroéthane, acétonitrile, éthanol (4/4/2/1 : v/v/v/v). La 1^{ère} ligne correspond au témoin aclonifen radioactif, la 2^{ème} ligne à l'extrait méthanolique de racines de maïs, et, la 3^{ème} ligne à l'extrait méthanolique de racines de tournesol. Les graphes de gauche correspondent à une quantification spot par spot des dépôts bruts maïs (centre) et tournesol (bas). Le graphe du haut correspond au témoin aclonifen. Afin de visualiser les spots, le dépôt sur chaque ligne correspond à 2000 dpm.

A titre de comparaison les spots récupérés à partir de l'extrait racinaire de maïs ont aussi été récupérés sur plaque de silice, solubilisé dans l'éthanol, centrifugés et analysés par spectrophotométrie en faisant varier le pH pour mettre en évidence les éventuelles hydroxylations provoquées classiquement par des monooxygénases cellulaires à cytochromes P₄₅₀ (tableau VI, 4). Le comportement spectrophotométrique des spots récupérés à la suite d'une séparation de l'extrait racinaire de maïs ne laisse pas supposer une cassure du double noyau DPE. De même les déplacements bathochromes des pics en milieu alcalin fort liés à la présence d'-OH phénoliques semblent ici trop faible pour avoir la preuve de la présence d'un aclonifen hydroxylé.

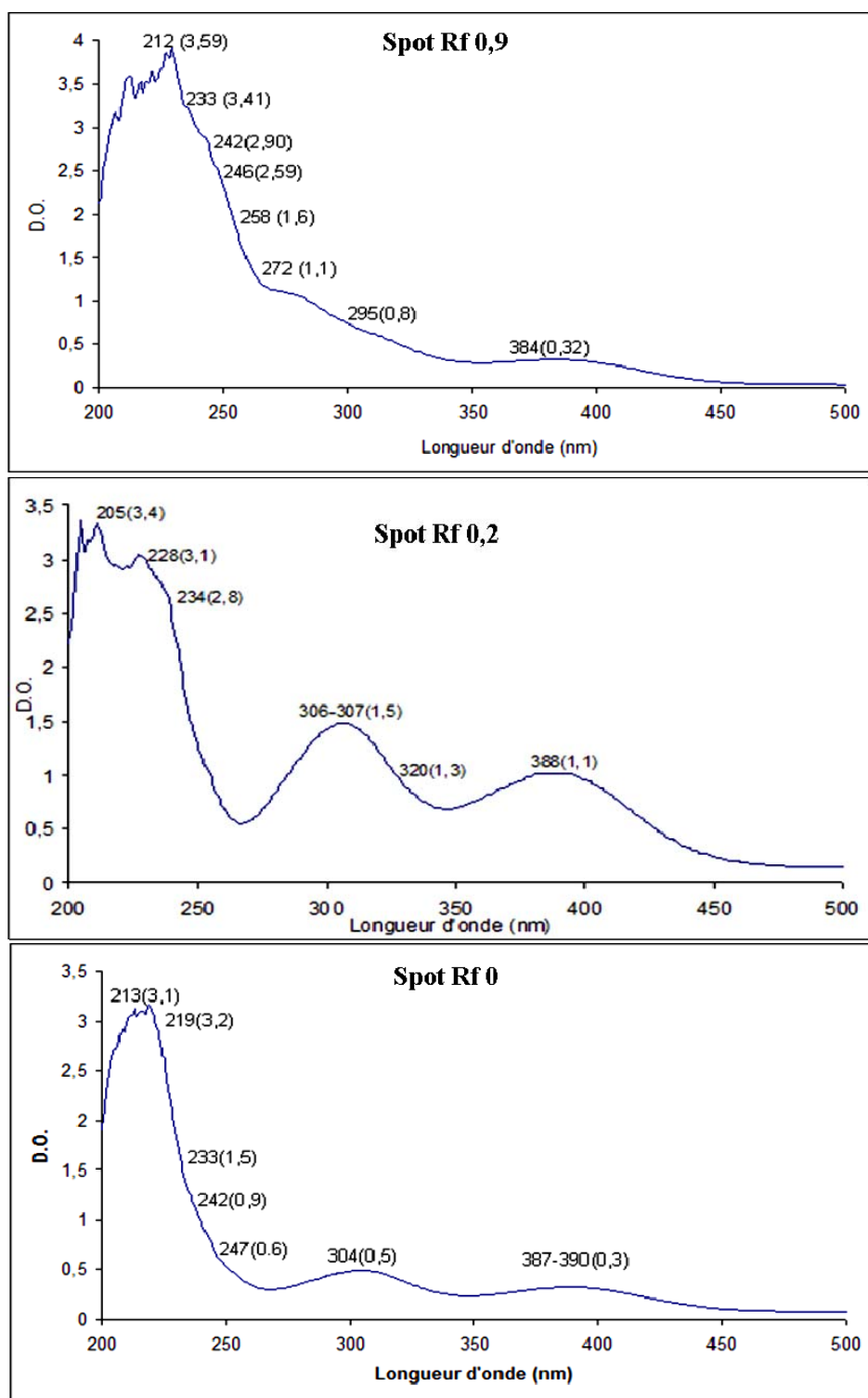


Figure VI, 14 : Spectrophotométries des trois spots obtenus par chromatographie à partir d'extract racinaire de tournesol (figure VI, 13) : spot à Rf 0,9 puis spot à Rf 0,2 et enfin spot à Rf 0. Le double pic vers 385 et 305 est la signature d'une structure DPE.

Tableau VI, 4 : Pics d'absorption entre 300 et 400 nm des spots récupérés dans l'éthanol à partir de l'extrait de racines de maïs chromatographié précédemment (figure VI, 13).

Rf	pH neutre	pH acide	pH basique
0,9	320-384	320-384	325-390
0,2	300-390	300-390	300-389
0,0	308-384	304-382	-----384

3b) Fractionnement de l'extrait méthanolique brut (racines de tournesol) par partage liquide-liquide en vue de séparer les différentes molécules dérivées de l'aclonifen.

Afin d'obtenir pour analyse chimique (recherche des structures des métabolites) des quantités raisonnables de métabolites présents dans les extraits méthanoliques issus du broyage de racines de tournesol nous avons effectué les partages suivants : la phase hydro-méthanolique issue du broyage (et concentrée) est partagée contre de l'éther de pétrole. La phase hydro-méthanolique restante est partagée alors contre l'éther éthylique puis l'acétate d'éthyle. Ainsi, l'extrait de départ correspond maintenant à 4 phases de polarité croissante : EP, éther éthylique, acétate d'éthyle et phase aqueuse résiduelle. Une partie aliquote de chacune de ces fractions (2000 dpm) est chromatographiée et visualisée grâce à l'utilisation du Phosphorimager (figure VI, 15).

La première remarque sur ce partage est la bonne récupération de la radioactivité introduite dans l'expérience. La quantité de radioactivité de départ (extrait méthanolique brut) est de 350000 dpm (pour 1,2 ml d'extrait). Après partage la phase EP (1,5 ml) contient 3000 dpm, la phase diéthyle éther (2ml) 65000 dpm, la phase acétate d'éthyle (2,5 ml) 86500 dpm, et la phase hydro-méthanolique (1,2 ml) 180500 dpm, soit un total récupéré de 335000 dpm (taux de récupération de 96%).

Les % de radioactivité récupérés bande par bande sont les suivants : bande 2 = 53%, bande 3 = 26%, bande 4 = 19%, bande 5 = 1%. Ce partage étant réalisé en gradient de polarité, on peut, à l'aide de ces résultats, indiquer que dans les racines de tournesol après 35 jours de culture il ne reste qu'1% d'aclonifen ($R_f = 0,9$), que les phases éther éthylique (26%) et acétate d'éthyle (19%) correspondent pour l'essentiel à des métabolites de lipophilie intermédiaire. Enfin, la phase aqueuse terminale renferme des composés polaires qui ne migrent pas et qui représentent 53% de la radioactivité récupérée. Pour avoir un tel R_f à partir d'une molécule mère aussi lipophile il faut supposer l'accrochage d'une molécule très hydrophile sur la molécule de départ. Cela peut être un ou plusieurs sucres (type glucose), un ou plusieurs acides aminés (type glutathion). De tels composés apparaissent couramment dans les mécanismes dits de phase II en détoxification cellulaire, ils sont issus d'une estérification contrôlée biochimiquement et sont classiquement nommés composés conjugués (conjugaison

entre le produit de départ et un composé naturel très hydrophile). L'atome de liaison entre les deux parties est souvent l'oxygène, mais aussi l'azote ou le soufre, et enfin, plus rarement le carbone. Ces liaisons sont plus ou moins fragiles, certaines ne résistant pas aux pH acides ou basiques et relibèrent dans le milieu les produits de départ.

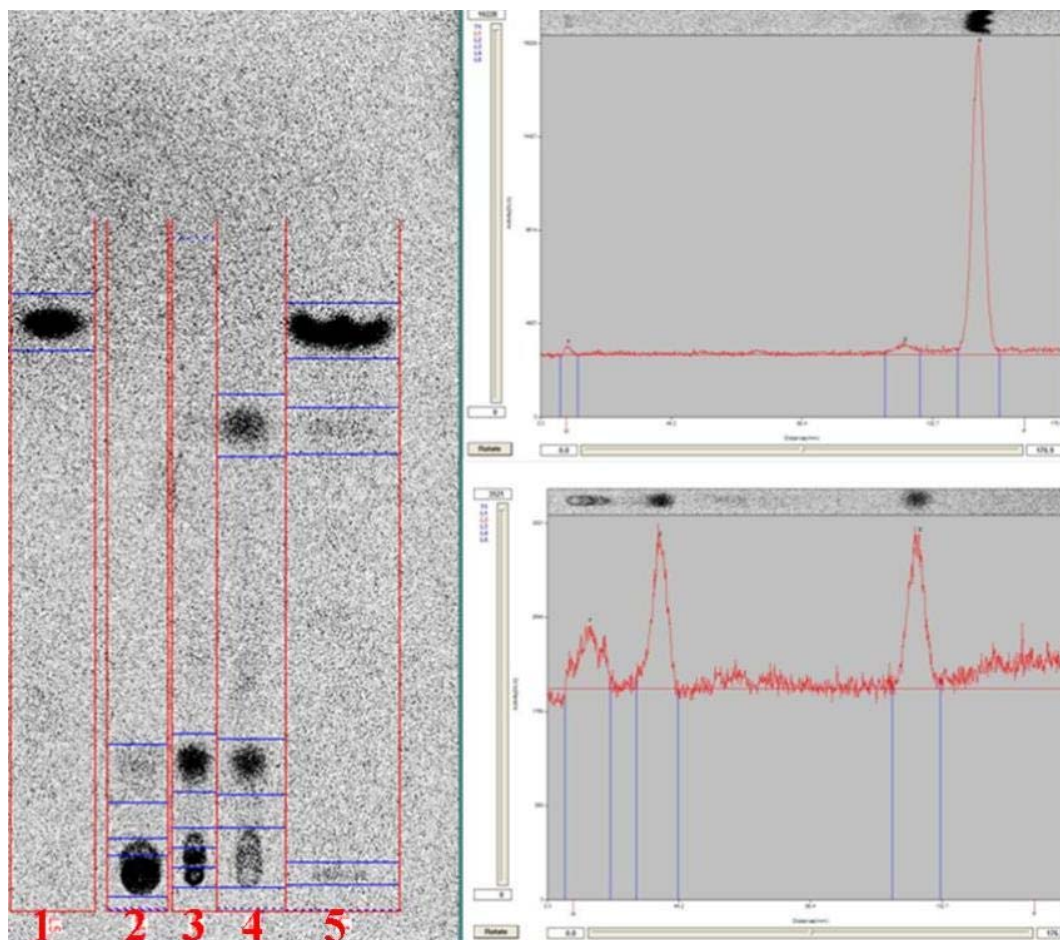


Figure VI, 15 : Autoradiographie (gauche) et exemple de quantification (droite) d'un chromatogramme sur plaque de silice relatif aux différentes fractions de polarité croissante obtenues à partir d'un extrait méthanolique de racines de tournesol cultivés 35 jours sur sable contaminé avec de l'aclonifen.. Le chromatogramme correspond à 5 dépôts : 1 – l'aclonifen témoin, 2 – la phase hydrométhanolique résiduelle, 3 – la phase acétate d'éthyle, et 4 – la phase EP obtenue lors du 1^{er} partage. Les spectres de la partie droite correspondent à la ligne de droite (extrait EP) et à la ligne 4 (extrait éther éthylique).

3c) Résultats de l'hydrolyse de la fraction la plus polaire contenue dans l'extrait méthanolique de racine de tournesol cultivés sur sable contaminé par l'aclonifen.

Sur une partie aliquote de l'extrait hydro-méthanolique final obtenu après partage liquide-liquide (extrait identique à celui chromatographié bande 2 de la figure VI, 15), nous avons tenté une hydrolyse acide et une hydrolyse alcaline afin de rompre les liaisons les plus fragiles entre les parties polaires (sucres, acides aminés, glutathion) et les aglycones plus lipophiles (parties correspondant à l'aclonifen ou certains de ses dérivés).

En ce qui concerne l'hydrolyse acide le protocole appliqué est le suivant : 200 µl de l'extrait hydro-méthanolique contenant la fraction racinaire la plus polaire (Rf 0), 200 µl d'HCl 12N, 600 µl d'eau. Ce mélange est maintenu 30 min. à 100°C. Après refroidissement, cette solution est fractionnée contre de l'éther éthylique.

L'hydrolyse alcaline utilise à peu près le même protocole en remplaçant l'acide par du KOH 5N qui sera neutralisé à la fin de l'hydrolyse par du HCl 12N. L'hydrolyse se passe à 25°C durant une nuit. La solution obtenue est partagée contre de l'éther éthylique.

Les résultats qualitatifs des deux hydrolyses réalisées sont présentés figure VI, 16.

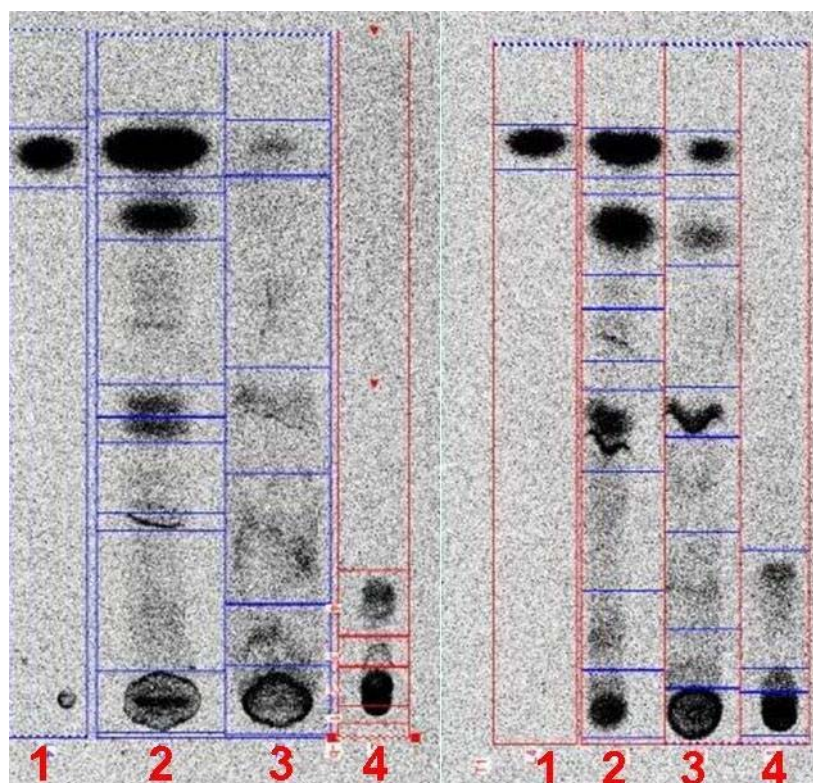


Figure VI, 16 : Autoradiographies montrant les résultats chromatographiques obtenus suite à l'hydrolyse alcaline (gauche) et acide (droite) d'un extrait polaire de racines de tournesol contaminées pendant 35 jours par de l'aclonifen. Pour chaque chromatogramme : ligne 1 = aclonifen témoin, ligne 2 = phase éther éthylique après hydrolyse, ligne 3 = phase aqueuse résiduelle. Le dépôt de droite sur chaque chromatogramme correspond à l'extrait avant hydrolyse (idem dépôt 2 figure VI, 15).

Avant hydrolyse le contenu de la 1ère phase aqueuse (dernier dépôt du chromatogramme de gauche) correspondant à des produits marqués, reste très polaire (60% sont à Rf 0 et 13% à Rf 0,2). La 2^{ème} phase aqueuse (dernier dépôt du chromatogramme de droite) est assez semblable : 63% à Rf 0, 10% à Rf 0,1 et 26% à Rf 0,2.

Suite à l'hydrolyse alcaline, un certain nombre de spots radioactifs apparaît dans la phase la moins polaire utilisée : l'éther éthylique. Dans cette phase l'appareil de lecture détecte 6 structures différentes : Rf 0 (4,5%), Rf 0,3 (0,7%), Rf 0,5 (1,5 %), Rf 0,5 (1,5%) , Rf 0,80 (5,7%) et Rf 0,9 (82 %). Le résultat majeur de l'hydrolyse avec KOH est la libération prépondérante d'un composé lipophile dont les caractéristiques chromatographiques correspondent à celles de l'aclonifen. Cela signifie qu'avant hydrolyse cet aclonifen devait

être sous forme conjuguée. Un deuxième composé moins bien représenté peut être issu d'une hydrolyse d'un autre conjugué : le Rf 0,8 (5,7% de l'ensemble). On peut imaginer un aclonifen hydroxylé, légèrement moins lipophile que l'aclonifen. Curieusement, le Rf 0 qui représente 4,6% ne semble pas dans la bonne phase. Il est très polaire et devrait être resté dans la phase aqueuse d'hydrolyse. (à moins d'une instabilité des dérivés de l'aclonifen dans l'éther éthylique). La phase aqueuse résiduelle est faiblement chargée sauf au point de dépôt où le tiers de ce qui est déposé se retrouve. Il pourrait éventuellement s'agir de C-glycoside d'aclonifen dont l'hydrolyse serait particulièrement difficile.

Les résultats issus de l'hydrolyse acide sont assez semblables à ceux de l'hydrolyse alcaline. La séparation entre la phase éther éthylique et la phase aqueuse résiduelle n'est pas d'aussi bonne qualité que pour l'hydrolyse précédente et dans ces deux phases on retrouve qualitativement les mêmes produits. Quoiqu'il en soit l'hydrolyse a provoqué l'apparition de 4 métabolites majeurs retrouvés dans les deux phases. Ces 4 spots ne prennent pas en compte le Rf 0.

Si l'on s'en tient à l'analyse du Phosphorimager pour la fraction éther éthylique on a Rf 0 (8%), Rf 0,1 (3,2%), Rf 0,5 (10,3%), Rf 0,6 (1,4%), Rf 0,7 (0,5%), Rf 0,8 (23,5%) et Rf 0,9 (53,1%). Ainsi, les 2 spots à Rf les plus forts (0,9 et 0,8) représentent environ 76% de l'extrait et sont les deux molécules les plus lipophiles. Le Rf le plus fort semble bien correspondre à de l'aclonifen libéré par hydrolyse et le Rf 0,8 pourrait être un aclonifen hydroxylé qui de ce fait serait légèrement moins lipophile.

Au stade de l'analyse où nous en sommes, les spots à Rf 0 après hydrolyse en phase acide et alcaline et migration sont difficiles à interpréter : soit il s'agit de métabolites conjugués de l'aclonifen qui ont résisté à l'hydrolyse, soit il s'agit de produits de dégradation occasionnée par la présence prolongée avec KOH et KCl, soit il s'agit d'une altération chimique locale de la plaque de silice qui, à cet endroit, ne réagit pas normalement.

Le résumé de cette expérimentation d'hydrolyse acide et alcaline peut s'exprimer ainsi. La fraction la plus polaire de l'extrait méthanolique racinaire contient probablement des molécules conjuguées d'aclonifen. En effet, l'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline libèrent l'aclonifen en masse (76% en phase alcaline et 82% en phase acide de restauration de l'herbicide libre). Un deuxième métabolite à Rf fort (0,8) est restitué par hydrolyse à hauteur de 5,7% en phase alcaline et 23,5% en phase acide. Sans argument autre que le Rf et l'analyse spectrale nous supposons la présence d'un aclonifen hydroxylé du type de la référence que nous avons à savoir l'aclonifen avec un -OH en position 4 sur le phényle non substitué. Les

deux molécules apparaissant avec les deux types d'hydrolyse à des Rf voisins de 0,5-0,6 sont probablement des DPE (spectres caractéristiques sans pouvoir en dire plus).

4) Pénétration et métabolisation de l'aclonifen dans les feuilles chez le tournesol traité en post-levée

Concernant la culture de tournesol en plein-champ, il existe une possibilité de traitement de post-levée avec l'aclonifen (préconisation d'emploi 1kg/ha). Nous avons déjà démontré chapitre III que l'aclonifen pouvait traverser la cuticule des plantules de tournesol et se concentrer dans l'espace cible de cet herbicide. A partir d'un traitement foliaire à la dose agronomique nous avons déterminé, en 48h, 4% de la matière active a pénétré dans les cellules de la feuille (35 μ M). Une telle concentration induit chez les plantes sensibles des symptômes de phytotoxicité. Dans le cas du tournesol traité en post-levée nous n'avons jamais eu le moindre effet phytotoxique visible à l'œil. Si l'obstacle à la pénétration n'est pas la raison de cette résistance au niveau foliaire il y a toute raison de soupçonner des processus de métabolisation au niveau des feuilles indépendants des processus mis en évidence dans les racines.

4a) Mise en évidence d'une métabolisation de l'aclonifen dans les feuilles de tournesol.

Les plantules de tournesol utilisées sont issues d'une culture de 5 semaines et sont à l'état 4 feuilles. Nous avons tout d'abord comparé les aptitudes à la métabolisation de feuilles *in situ* et de feuilles détachées des plantes et mises en survie sur papier filtre humide dans une boîte de Pétri. Pour cette comparaison nous n'utilisons qu'une faible quantité d'herbicide (uniquement radioactif, 80.000 dpm/feuille soit 1 nmole). La solution déposée à la micropipette est réalisée dans l'eau. Chaque feuille reçoit 250 μ l de solution. L'expérience dure 48 h. A ce temps chaque feuille est lavée 2 x avec 5 ml d'eau et 2 x avec 5 ml d'éthanol pour enlever la part de traitement resté en surface. Les rinçages sont vides de radioactivité, la pénétration est totale en 48h à cette concentration. La figure VI, 17 correspond à l'autoradio de feuilles de tournesol traitées et rincées.

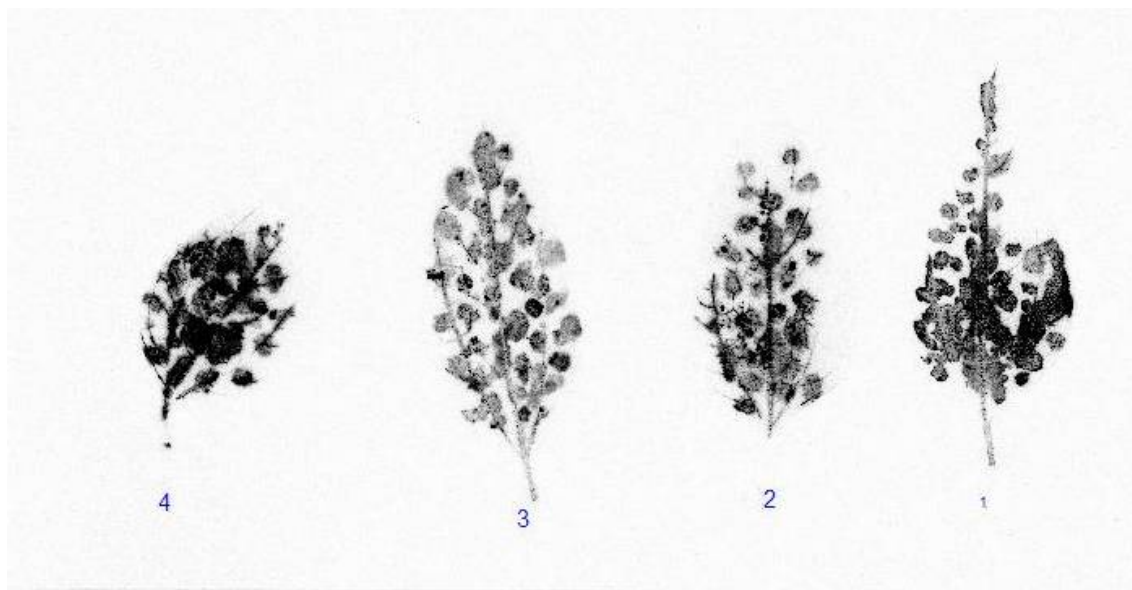


Figure VI, 17 : Autoradiographies de feuilles de plantules de tournesol 5 semaines après le semis. Le traitement à l'aclonifen a été réalisé par dépôt de gouttes d'une solution herbicide radioactive. Les feuilles présentées ont été rapidement rincées à l'eau et à l'éthanol : les taches sombres visualisent d'herbicide ayant pénétré dans les feuilles.

Les feuilles ainsi préparées sont broyées dans de l'éthanol (2x 1 ml), centrifugées. Le culot est repris par 2x 1 ml d'eau. Une partie aliquote de l'extrait éthanolique (2000 dpm) et une partie aliquote de l'extrait aqueux (2000 dpm) sont chromatographiées sur plaque de silice. Le résultat de la chromatographie est obtenu par Phosphorimager (figure VI, 18).

L'observation du chromatogramme révélé par le Phosphorimager nous donne 3 indications : 1) les feuilles de tournesol maintenues en survie ont un comportement vis-à-vis du traitement en tous points comparable (les dépôts d'herbicide sur la feuille étant plus faciles sur feuilles isolées, c'est cette méthode qui sera privilégiée par la suite), 2) le système foliaire du tournesol est capable de transformer l'aclonifen ($R_f = 0,9$) en un ou plusieurs produits de nature très polaires ($R_f = 0$) chimiquement formés avec une base d'aclonifen, et, 3) cette transformation probablement d'origine métabolique est dans ce cas très rapide pour 48h d'expérience. En effet, les résultats chiffrés par l'appareil de lecture sont les suivants : pour les feuilles traitées après avoir été détachées de la plante le $R_f 0$ représente 53,3% du total extrait (46,7 étant encore de l'aclonifen). Sur les feuilles restées en place sur la plantule les valeurs sont similaires $R_f 0 = 57,8\%$ et R_f de l'aclonifen = 42,2%. Ainsi, chez la plantule de tournesol nous avons mesuré une transformation de plus de 50% de la matière active en 48h. Le fait qu'il n'y ait pas de différence majeure entre feuille en place et feuille excisée indique la transformation de l'aclonifen utilisé en post-levée sur tournesol est dépendante uniquement de la physiologie foliaire.

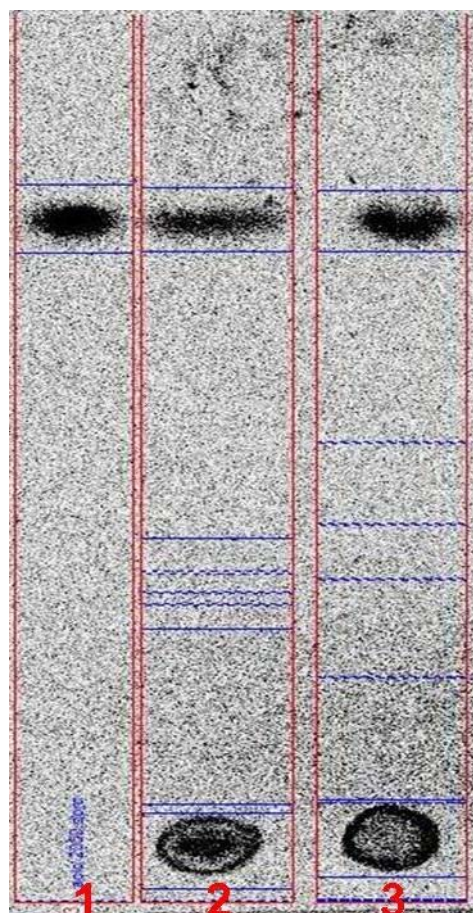


Figure VI, 18 : Autoradiographie d'un chromatogramme sur silice d'extraits bruts de feuilles ayant subi un traitement foliaire par dépôt de goutte d'aclonifen marqué. Les extraits éthanoliques de feuilles ont été obtenus 48h après traitements. Colonne 1 : aclonifen témoin, colonne 2 : extrait d'une feuille encore attachée à la plante mère, colonne 3 : extrait d'une feuille détachée au moment du traitement et maintenue en survie dans une boîte de Pétri humidifiée en fermée.

4b) Hydrolyses :

Les produits générés par l'action de la feuille de tournesol en 48h à partir de l'aclonifen possèdent dans notre système chromatographique un R_f0 ce qui indique un très grand changement de structure qui peut être associé à une conjugaison avec des substrats polaires de type sucres, acides aminés ou petits peptides du genre glutathion. Nous avons donc sur ces fractions polaires tenté des hydrolyses acide (HCl) et alcaline suivant les protocoles expliqués plus haut dans le chapitre. L'hydrolyse étant réalisée en phase aqueuse, celle-ci est fractionnée contre de l'éther éthylique au cas où des produits peu polaires seraient libérés. La figure VI, 19 montre les résultats des deux hydrolyses obtenus après chromatographie et autoradiographie. Les résultats de l'hydrolyse sont la restitution à 100% de la forme aclonifen et elle seule. Toute la partie de structure de R_f0 , inconnue pour l'instant, qui assure une forte polarité au(x) produit(s) transformé(s) a été libérée par HCl et KOH. Une activité de conjugaison avec des sucres ou des dérivés d'acides aminés reste vraisemblable.

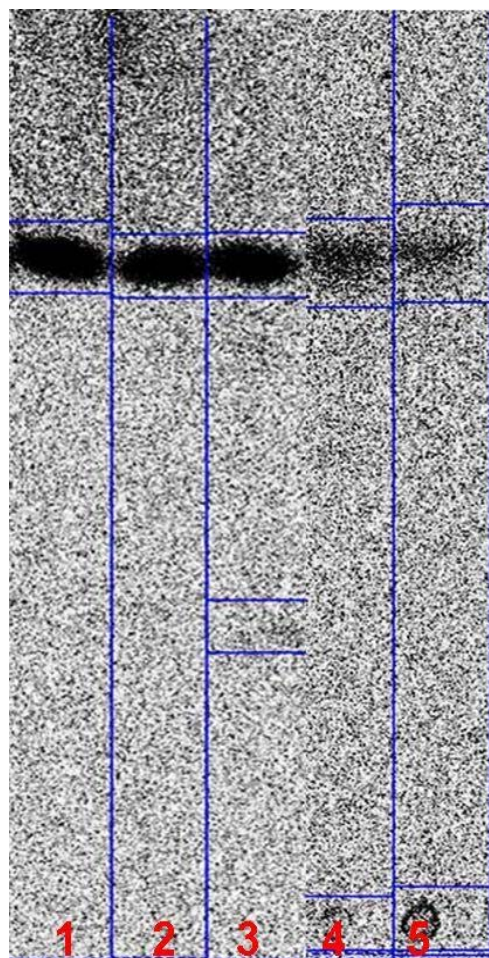


Figure VI, 19 : Autoradiographie d'un chromatogramme illustrant la transformation des dérivés polaires de l'aclonifen obtenus après 48h dans des feuilles de tournesol traité.

Colonne 1 : témoin aclonifen, colonne 2 : phase éther éthylique après hydrolyse HCL, colonne 3 : phase éther éthylique après hydrolyse KOH, colonne 4 : extrait de la fraction polaire après hydrolyse HCL, colonne 5 : après hydrolyse KOH.

5) Obtention *in vitro* de métabolites de l'aclonifen à l'aide d'extraits enzymatiques issus du tournesol.

L'activité de transformation de l'aclonifen par les feuilles de tournesol est probablement liée à des activités enzymatiques de détoxification classiquement décrites pour tout organisme vivant. Nous avons tenté d'isoler sommairement le pool protéique des feuilles de tournesol pour vérifier *in vitro* si nous pouvions retrouver les activités de transformation de l'aclonifen démontrées sur feuilles entières.

5a) Obtention d'une poudre acétonique contenant des activités enzymatiques de feuilles de tournesol.

A partir de 100 g de feuilles fraîches de tournesol nous effectuons un broyat dans de l'acétone (2 x 200 ml). Par filtration nous avons un surnageant (éliminé) et un culot appelé « poudre acétonique ». Ce culot est laissé à l'air libre pour le débarrasser de toute trace d'acétone. Ce culot correspond à une masse sèche de 7,2 g. Il représente notre réserve de protéines brutes foliaires (stocké à - 22°C).

5b) Mise en œuvre de l'activité enzymatique de la poudre acétonique.

Une petite quantité de poudre acétonique (0,5 g) est suspendue dans 20 ml d'un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2 additionné de 150 mg de PVP. Cette étape de suspension dure 2h et se déroule à 4°C. Après cette étape, la suspension est centrifugée à froid à 14000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et subit un dosage de protéines. Le protocole utilisé pour nos feuilles de tournesol donne un dosage voisin de 1mg de protéines/ml de surnageant. C'est ce surnageant qui va servir de milieu pour la transformation éventuelle de l'aclonifen.

Une petite quantité de milieu « tampon phosphate (1485 µl soit près de 1,5 mg de protéines) est additionnée d'une quantité d'aclonifen froid et radioactif (15 µl) pour une concentration finale de $[5 \cdot 10^{-4}]$ M. Le substrat polaire accroché par transformation foliaire à l'aclonifen est supposé être un petit peptide (le glutathion = GSH). C'est avec du GSH commercial (Sigma) que nous avons tenté la 1^{ère} conjugaison *in vitro*, (3,5 µl de GSH, $[5 \cdot 10^{-5}]$ M finale).

5c) Résultats de l'action *in vitro* de la poudre acétonique de feuille de tournesol sur la modification enzymatique de l'aclonifen.

Les résultats sont présentés figure VI, 20. L'autoradiographie et les calculs obtenus avec le Phosphorimager montrent tout d'abord que sans présence de GSH, la poudre acétonique de feuille de tournesol ne produit pas de métabolites polaires (exclusion faite d'une conjugaison avec d'autres substrats polaires types sucres).

En présence de GSH exogène et d'extrait protéique de feuille, la conjugaison glutathion-aclonifen est possible *in vitro*. Cette conjugaison représente très probablement la forme radioactive à Rf0 sur la figure VI, 20. Sur les trois dépôts associés à la présence de GSH exogène, les % d'aclonifen transformés en produits polaires sont de 31%, 43% et 45% respectivement après 3h, 6h et 20h d'incubation.

Sur les tracés des expérimentations 2, 3, 4 de la figure VI, 20 apparaissent une trace d'un métabolite intermédiaire de Rf 0,5 représentant 10 à 15% du dépôt total. Sur ce métabolite nous n'avons pour l'instant aucune information structurale. Le fait qu'il n'apparaisse pas dans les tracés sans GSH augmente notre interrogation.

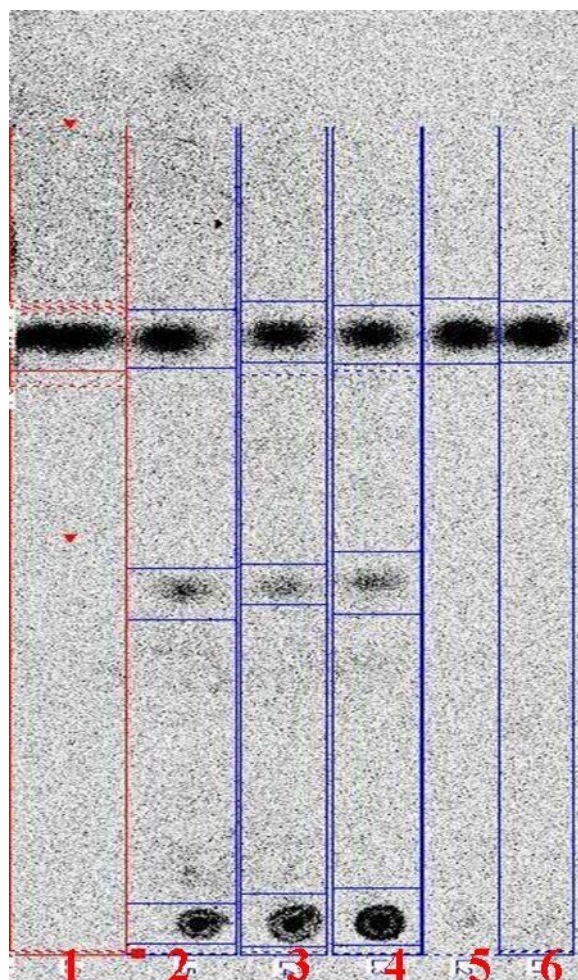


Figure VI, 20 : Autoradiographie d'un chromatogramme présentant les différents dérivés de l'aclonifen obtenus *in vitro* dans différentes conditions expérimentales. Colonne 1 = aclonifen témoin, colonne 2 = extrait protéique + aclonifen + GSH (incubation 3 h), colonne 3 = extrait protéique + aclonifen + GSH (incubation 6 h), colonne 4 = extrait protéique + aclonifen + GSH (incubation 20 h), colonne 5 et 6 absence de GSH (5 = incubation 3h, et 6 = incubation 20h).

6) Effet d'un inhibiteur des glutathion-S-transférases infiltré à l'intérieur des feuilles de tournesol.

Afin de mettre en évidence, *in vivo*, la réalité de la transformation aclonifen/aclonifen-GSH nous avons cherché à démontrer le rôle d'un inhibiteur des GST (le diéthylmaléate ou DEM), sur feuilles entières.

L'expérience se déroule sur feuilles entières excisées sur plantules de 5 semaines. Les

feuilles témoins sont infiltrées par le pétiole, sous vide avec de l'eau pendant 10 min. Dans le même temps, les feuilles traitées par le DEM inhibiteur de GST sont infiltrées sous vide (l'inhibiteur soluble dans l'eau est appliqué à la dose de 40 ppm). Les feuilles témoins et traitées sont ensuite rincées à l'eau et installées dans des boîtes de Pétri humides. Sur chaque feuille sont effectués des dépôts de gouttes de solution d'aclonifen radioactif (240 000 dpm/feuille soit 3 nmoles/feuille). Ainsi traitées, les feuilles restent 48h dans les boîtes de Pétri fermées. Au bout de ce temps, les feuilles sont rapidement rincées 2 x à l'eau puis 2 x à l'éthanol. La proportion de ce qui n'est pas rentré (et enlevé par les rinçages) n'atteint jamais plus de 1% de la quantité déposée (considéré comme négligeable).

Les feuilles sont alors broyées dans 2 x 1 ml d'éthanol puis dans 2 x 1 ml d'eau. Ces fractions sont centrifugées séparément puis déposées sur plaque de silice pour analyse. Les résultats chromatographiques sont présentés figure VI, 21 et les % des différentes formes d'aclonifen retrouvées sont indiqués tableau VI, 4.

Tableau VI, 5 : Quantité de radioactivité extraite (dpm) et % d'aclonifen et de dérivés de l'aclonifen obtenus suivant les extraits de feuilles de tournesol traitées ou non avec un inhibiteur de GST. Les tracés chromatographiques indiquent qu'il n'y a que deux niveaux de Rf. Les quantités de radioactivité récupérées extrait par extrait sont les moyennes de 3 essais. DEM = diéthylmaléate, inhibiteur des GST.

		Extrait EtOH DEM	Extrait H ₂ O DEM	Extrait EtOH sans DEM	Extrait H ₂ O sans DEM
radioactivité extraite (dpm)		169000	5800	195000	13500
% d'aclonifen et de dérivés	Rf 0	21	30	54	80
	Rf 0,9	79	70	46	20

En tenant compte des % de répartition entre les différents spots lus sur le chromatogramme et indiqués tableau VI, 5 nous pouvons calculer les % des deux composés visualisés dans les deux situations expérimentales avec et sans DEM. La somme des Rf polaires produits en présence de DEM correspondent à 37 230 dpm et le Rf 0,9 à 137 570 soit 21,3% pour le Rf 0 et 78,7% pour le niveau aclonifen. Dans les mêmes conditions de calcul pour les feuilles témoins le Rf 0 représente 50,5% et le Rf 0,9 49,5%. Le bilan de radioactivité entre ce qui a été déposé sur feuille et ce qui a été retrouvé dans les extraits et de l'ordre de 90%, la partie manquante a été retrouvé par minéralisation des restes de feuilles.

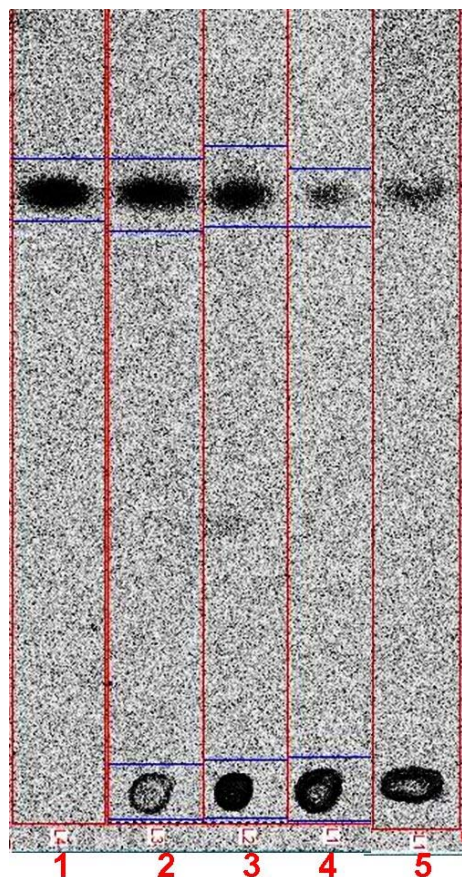
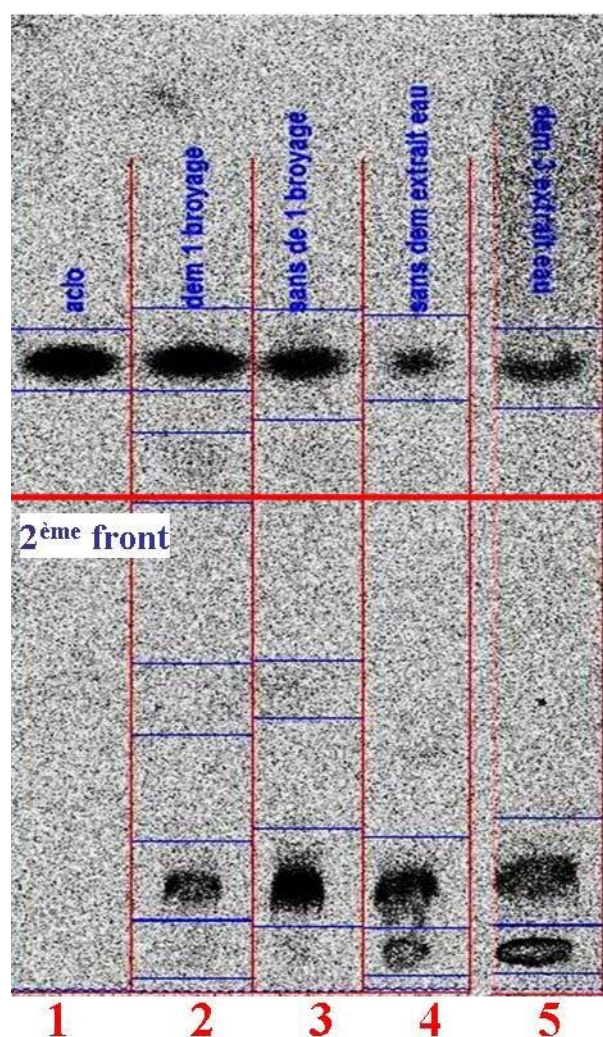


Figure VI, 21 : .Autoradiographie d'un chromatogramme permettant de déduire le rôle joué par un inhibiteur des GST : le diéthylmaléate (DEM) dans des feuilles de tournesol traitées par l'aclonifen. Colonne 1 = témoin aclonifen, colonne 2 = extrait éthanolique de feuilles traitées au DEM, colonne 3 = extrait éthanolique de feuilles sans DEM, colonne 4 = extrait aqueux de feuilles sans DEM, colonne 5 = extrait aqueux de feuilles traitées au DEM.

La conclusion de cet essai avec infiltration d'un inhibiteur de GST est qu'il met en évidence la production par les feuilles de tournesol d'un conjugué aclonifen-glutathion. Nos conditions expérimentales d'inhibition conduisent soit à une inhibition incomplète (présence d'un Rf 0 en présence de DEM), soit à une inhibition totale permettant de visualiser un 2^{ème} Rf polaire qui n'a rien à voir avec une forme glutathion.

Aussi, avons-nous cherché les conditions chromatographiques capables de modifier le comportement du Rf 0. Nous avons repris le chromatogramme présenté figure VI, 21 pour une 2^{ème} migration chromatographique avec un solvant légèrement modifié (rendu plus polaire) de la manière suivante : dichloroéthane, acétonitrile, éthanol, eau (20/10/20/0,5 : v/v/v/v). Les résultats de cette deuxième migration sont illustrés figure VI, 22. Pour les extraits éthanoliqes le spot à Rf 0 dans le système précédent migre un peu (Rf 0,1) et laisse le point de dépôt vide de composés radioactifs. Ce composé semble se retrouver comme la forme polaire majoritaire dans les extraits aqueux de feuilles traitées ou non par DEM (58% de l'extrait eau témoin et 40,5% de l'extrait eau provenant des feuilles traitées avec DEM).



Ces deux fractions aqueuses présentent au moins un deuxième dérivé de l'aclonifen, avec un nouveau Rf 0, et non présent dans les extraits éthanoliqes. Sur ces deux structures polaires issues de la transformation métabolique de l'aclonifen par les feuilles de tournesol, il ne nous est pas possible d'affirmer quelle est la structure st associée au GSH et laquelle ne l'est pas : seuls des collègues compétents en analyse chimique pourraient nous permettre d'avancer dans cette direction.

Figure VI, 22 : Résultats chromatographiques liés à une augmentation de la polarité du solvant de migration et mise en évidence d'un composé dérivé très polaire (Rf0) extrait uniquement dans la fraction H₂O. Solvant utilisé pour la 2^{ème} migration : dichloroéthane, acétonitrile, éthanol, eau (20/10/20/0,5 : v/v/v/v).

7) Les P₄₅₀ sont-ils impliqués dans la transformation foliaire de l'aclonifen chez le tournesol ?

Nous avons cherché à savoir si le métabolisme foliaire du tournesol était capable d'induire l'apparition de métabolites hydroxylés de l'aclonifen, eux même transformés par une phase II de glycosylation en produits très polaires du fait d'une conjugaison avec un ou plusieurs sucres.

7a) Expérience *in vitro*

20 g de feuilles fraîches de tournesol (5 semaines) sont broyées dans de l'azote liquide. La poudre glacée obtenue est suspendue dans 200 ml d'un tampon de 0.1 M tampon potassium phosphate à pH 7,5. La suspension est homogénéisée 15 min à 4°C, filtrée sur papier Whatman, le surnageant est centrifugé 15 min. à 10000 g à 4°C. Le culot obtenu est écarté et le surnageant est ultracentrifugé à 100000g. (Frear et al., 1994). Le culot obtenu est enrichi en fraction microsomale porteur d'activités monooxygénases à cytochromes P₄₅₀ capables d'hydroxyler divers composés naturels ou de synthèse. Le culot est repris par 1 ml de tampon additionné de DTE et glycérol. Le contenu protéique du mélange est de 742±60 µg/ml. Le culot est conservé à -80°C avant utilisation.

L'expérimentation *in vitro* consiste à remettre en solution une quantité définie de la suspension microsomale dans du tampon auquel est ajouté l'aclonifen radioactif (124000 dpm soit 1,5 nmole par essai donnant une concentration finale de 5.10⁻⁶ M). L'expérience se déroule sous agitation modérée. A temps réguliers l'expérience est arrêtée : T0, T 10 min., T 20 min., T 30 min. et T 45 min. Après ce temps de 45 min. la littérature indique que l'activité P₄₅₀ diminue très rapidement (Frear et al., 1991 ; Lau et O'Keefe, 1996 ; Topal et al., 1996).

Pour l'expérimentation *in vitro* : 25-50 µg microsomale protein, 5.10⁻⁴ M 10µl aclonifen froid dans 0.1 M MOPS, pH 7 concentration finale de 5.10⁻⁶ M, 2 mg/ml BSA, 400 µM NADPH, 20 mM glucose 6-phosphate, 0.1 U glucose-6-phosphate déshydrogénase ont été utilisés.

Pour chaque temps, la phase aqueuse (tampon) est récupérée et partagée contre l'éther éthylique. Les fractions aqueuses et étherées provenant de chaque essai sont chromatographiées suivant notre protocole habituel suivi d'une lecture au Phosphorimager. Dans le meilleur des cas la transformation de l'aclonifen obtenue est de 3% (à T 45 et un produit de transformation à Rf 0).

Bien que quantitativement décevants, ces résultats peuvent laisser imaginer une transformation de l'aclonifen en OH-aclonifen lui même rapidement transformable en aclonifen-O-glycoside.

7b) Expériences *in vivo* pour visualiser une activité P_{450} des feuilles de tournesol vis-à-vis de l'aclonifen.

Reprenant le protocole d'infiltration d'un inhibiteur des GST dans des feuilles de tournesol, nous avons infiltré sous vide une solution aqueuse de pipéronyle butoxide (PBO à la dose de 40 ppm) décrit comme inhibiteur des $cyt P_{450}$. Les feuilles infiltrées (témoins et essais) sont rincées. Sur chaque feuille est déposé de l'aclonifen marqué (124 000 dpm par feuille soit 1,5 nmole environ). Les feuilles sont gardées 48h dans des boîtes de Pétri closes. Les feuilles sont alors broyées dans 2 x 1 ml d'éthanol puis 2 x 1 ml d'eau. Le contenu en radioactivité des fractions eau était si faible que les dépôts chromatographiques ont été impossibles. Ce sont les fractions éthanoliques qui ont été utilisées et donner l'autoradiographie figure VI, 22 a.

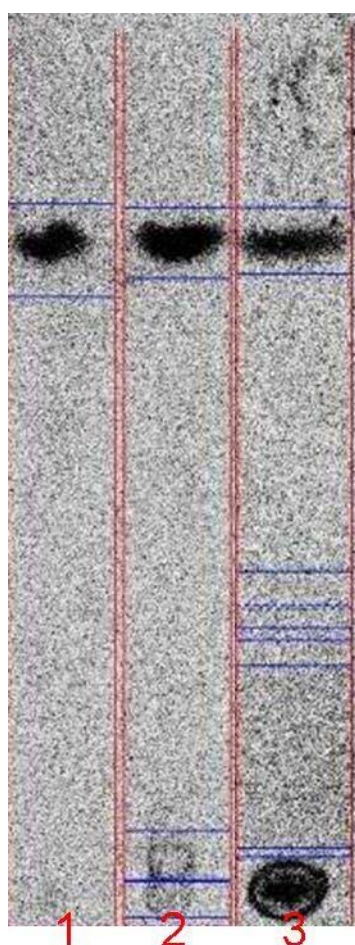


Figure VI, 22 a : Résultats chromatographiques liés à 1 : Aclonifen témoin, 2 : extrait éthanolique de feuille traité au PBO, 3 : extrait éthanolique de feuille sans PBO.

Pour l'expérimentation témoin 50% environ de l'aclonifen apporté est transformé en produits polaires (sûrement 2 dont l'un pourrait être un conjugué glutathion. Pour l'essai avec le PBO inhibiteur de P_{450} , seuls deux produits polaires apparaissent (R_f 0,1 soit 5% du total radioactivité et R_f 0 pour 8%).. Faut-il imaginer qu'un des deux spots soit le conjugué glutathion avec une concentration qui semble bien faible en comparaison des expérimentations précédentes ? Faut-il imaginer que la forme dominante du métabolisme foliaire soit une forme glycosylée après une hydroxylation P_{450} dépendante de l'aclonifen ?

Nos expériences ne permettent pas d'être très affirmatif.

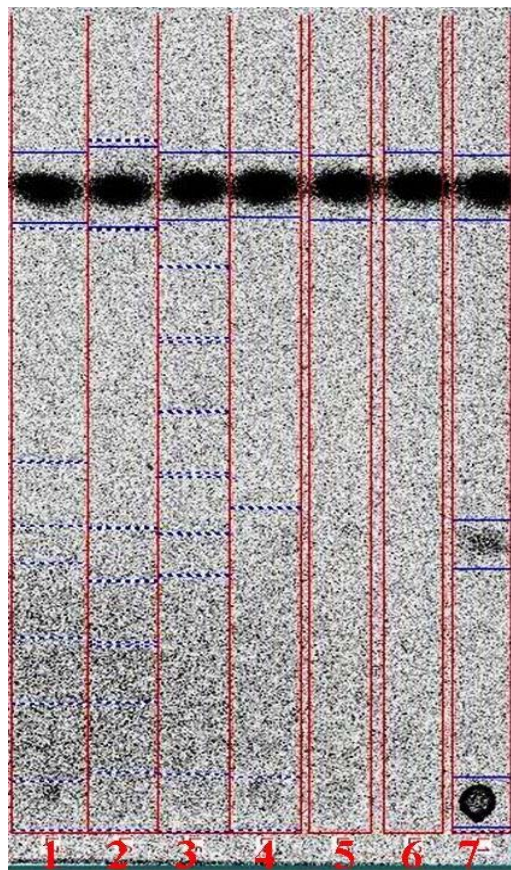
8) Mise en évidence de mécanismes de détoxification de l'aclonifen par la plantule de maïs.

Contrairement aux plantules de tournesol qui ne présentent jamais de symptômes de phytotoxicité vis-à-vis de l'aclonifen, le maïs, dans certaines conditions de culture (dose agronomique sur sable), présente les symptômes classiques sur feuilles. Ces conditions sont sévères et n'existent probablement pas sur le terrain. Le maïs en culture normale (plein champ) est en situation de tolérer l'herbicide étudié. Cependant sa marge de sélectivité semble nettement plus faible que celle du tournesol. Par des expériences *in vitro* nous avons tenté de

mettre en évidence les possibilités de métabolisation de l'aclonifen dans l'espace racinaire et dans l'espace foliaire du maïs.

A partir de plantules de maïs de 15 jours, nous avons réalisé des poudres acétoniques de feuilles d'une part et de racines d'autre part (selon le protocole décrit dans ce chapitre en F, a).

8a) Transformations de l'aclonifen par un extrait protéique de racines de maïs :

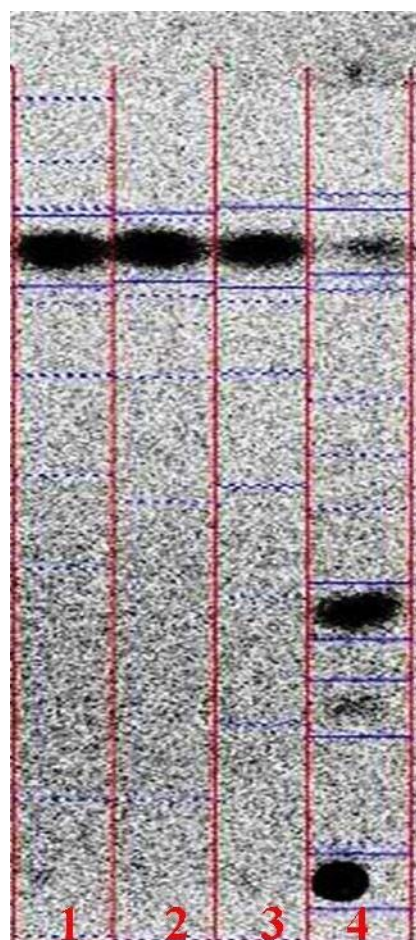


La figure VI, 23 résume d'étude cinétique de la transformation de l'aclonifen par de des activités enzymatiques présentes dans la poudre acétonique de racines de maïs. L'expérience dure 3, 6 et 20 h. Les réactions enzymes-substrats sont réalisées avec ou sans ajout de GSH exogène. Figure VI, 23 : Autoradiographie d'un chromatogramme correspondant à une cinétique de transformation *in vitro* de l'aclonifen mis en présence d'une activité enzymatique extraite de racines de maïs âgés de 15 jours. Cette activité enzymatique est mesurée soit en présence de glutathion exogène (GSH), soit en absence. Ligne 1 = aclonifen témoin, ligne 2 = incubation 3h avec GSH, ligne 3 = 3h incubation sans GSH, ligne 4 = 6h avec GSH, ligne 5 = 6 h sans GSH, ligne 6 = 20 h sans GSH, ligne 7 = 20 h avec GSH.

Aucune transformation de l'aclonifen n'est détectée avant 20 h en présence ou non de GST. A 20h, en présence de GST exogène, une transformation forte de l'aclonifen mis au départ est enregistrée. Trois spots apparaissent sur le chromatogramme : l'aclonifen (R_f 0,9) représente encore 63,3% du dépôt de départ, un produit de lipophilie intermédiaire (R_f 0,4) correspond à 15,6% du stock de départ, le reste (21%) correspond à un R_f 0 (ce spot peut correspondre à 1 ou plusieurs produits polaires. En particulier, il pourrait s'agir d'un glutathion-aclonifen. Ainsi, il apparaît un pouvoir de résistance racinaire chez le maïs vis-à-vis de l'aclonifen qui pourrait bien être associé à la présence dans cet organe d'une activité GST capable de reconnaître comme substrat l'aclonifen.

8b) Transformation de l'aclonifen par un extrait protéique extrait de feuilles de maïs.

Une opération totalement identique à celle présentée ci-dessus a été réalisée avec un extrait global des protéines foliaires de maïs. Les conditions expérimentales ont été strictement les mêmes que pour l'extrait racinaire (en particulier la quantité de protéines mise dans chaque essai). Les résultats sont présentés figure VI, 24. Qualitativement il y a une ressemblance avec les résultats ci-dessus : pas de transformation sans ajout de GSH, il faut attendre 20 h d'incubation pour voir apparaître des métabolites. Avec l'extrait protéique de feuilles de maïs, à 20 h, en présence de GSH exogène, le chromatogramme laisse voir 4 spots : l'aclonifen (R_f 0,9) pour 8,8% du total de départ, un R_f 0,4 représentant 32%, un R_f 0,2 minoritaire à 4%, et enfin, un R_f 0 majoritaire à plus de 55%. Une partie au moins de ce spot polaire doit



appartenir à une forme conjuguée glutathion-aclonifen.

Toutes conditions expérimentales étant les mêmes, il semble que l'extrait protéique foliaire soit légèrement plus performant que l'extrait racinaire : à 20h le stock d'aclonifen est encore de 63% pour l'extrait de racines, alors que pour l'extrait de feuilles il n'est plus que de 9%. Dans ces conditions, en plein champ, peut être est-il préférable de faire avec l'aclonifen sur maïs, de la post-levée.

Figure VI, 24 : Autoradiographie d'un chromatogramme correspondant à la mise en évidence de l'aclonifen et de divers métabolites apparaissant *in vitro* lors d'incubations dans un tampon, d'activités enzymatiques globales de feuilles de maïs, en présence ou non de GSH exogène. La ligne 1 = aclonifen témoin, ligne 2 = incubation 3 h en présence de GSH, ligne 3 = incubation 20 h sans GSH, et ligne 4 = incubation 20 h avec GSH.

8c) Comparaison de la sélectivité vis-à-vis de l'aclonifen entre tournesol et maïs.

Une partie au moins de l'activité de détoxification de l'aclonifen dans les deux plantes étudiées semble être liée à la présence dans les feuilles et dans les racines de maïs et de tournesol de glutathion-S-transférases capables de reconnaître l'aclonifen et, en présence de glutathion, de produire le conjugué-glutathion. Y a-t-il entre les deux plantes des différences de stocks de GST susceptibles d'expliquer les différences de sélectivité ?

Nous avons recherché à quantifier le pool de GST dans des plantules âgées de 15 jours mises dans différentes conditions : maïs et tournesol, parties aériennes et racines, plantes traitées à l'aclonifen (dose agronomique) et plantes témoins (soit 8 situations expérimentales). Les activités GST ont été extraites et mesurées suivant la méthode décrite par Dr. Peter Schröder (Schröder et al, 1990). Le substrat artificiel utilisé comme conjugué avec le glutathion est le CDNB dont le conjugué dérivé absorbe à 340 nm. Les activités GST extraites dans les 8 conditions explicitées sont présentées figure VI, 25

Le résultat majeur qui ressort de la figure VI, 25 est que quelle que soit la situation étudiée, les teneurs en GST sont très nettement moins fortes dans le tournesol que dans le maïs (ordre global d'un facteur 20). Pour le tournesol il n'est pas évident de trouver une différence entre plantes traitées et témoins, ni entre contenu foliaire et racinaire.

Chez le maïs les activités GST sont fortes aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Au niveau foliaire la présence ou non du traitement ne change visiblement pas le pool de GST. Par contre le pool de GST racinaire augmente de 80% dans l'échantillon traité à l'aclonifen. Nous avons probablement là l'expression d'une induction de GST du fait de la présence de l'aclonifen. Cependant rien n'indique que les GST induites par l'aclonifen soient en situation de conjuguer aclonifen et glutathion.

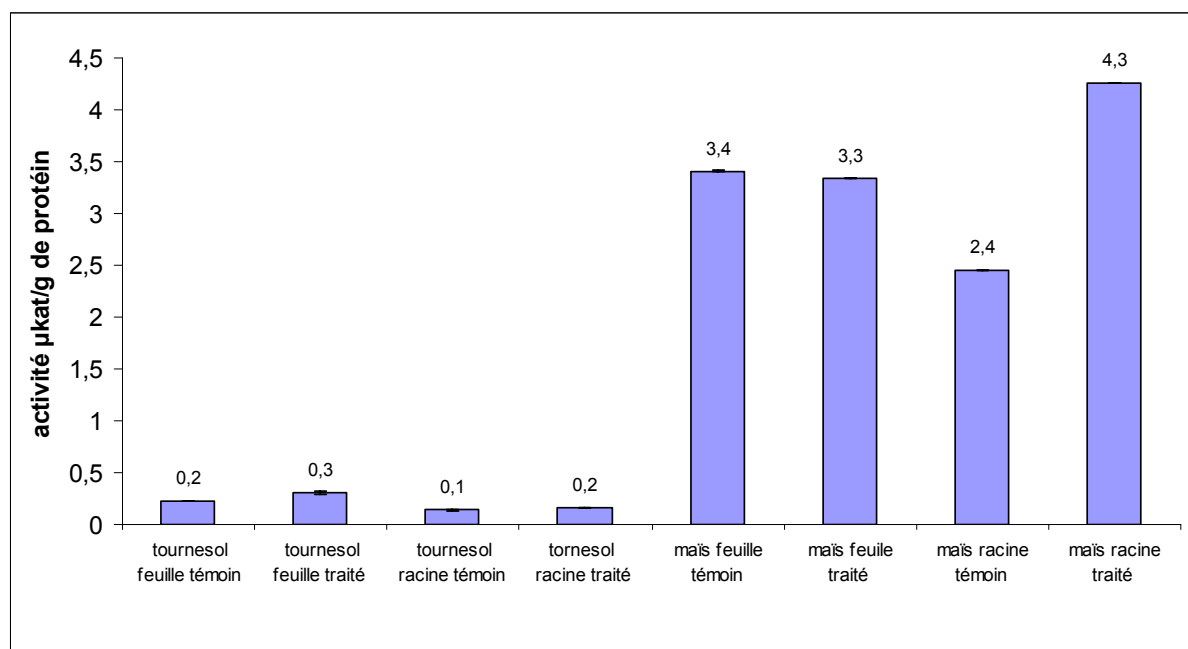


Figure VI, 25 : Activités glutathion-S-transférases «totales» dosé avec CDNB (μkat/g protéine) mesurées (moyenne de 3 répétitions) dans différents organes (feuilles et racines), dans différentes plantes (tournesol et maïs), et dans différentes situation de traitement aclonifen (témoins et traitées à la dose agronomique).

C) Conclusion :

Nous allons tenter de conclure sur la sélectivité du tournesol et du maïs vis-à-vis de l'aclonifen.

En ce qui concerne les symptômes de toxicité nous n'en avons trouvé aucun, ni en pré- ni en post-levée, avec le tournesol malgré des conditions de traitement bien plus dures que celles du terrain. Dans ces conditions les plus dures (dose agronomique sur sable) nous avons mis en évidence des symptômes de dépigmentation sur les feuilles 1 et 2 du maïs. Dans des conditions normales de culture ces symptômes n'existent pas.

Y a-t-il une barrière à la pénétration du produit ? En post-levée sur tournesol nous avons fait la démonstration précédemment que la formulation Challenge 600 permettait une pénétration foliaire (peut être pas optimale mais suffisante pour tuer les plantes sensibles). Cela n'est pas le cas avec le tournesol. Ainsi, la cuticule des plantes étudiées n'est pas une barrière de protection contre la pénétration de l'aclonifen.

Les racines peuvent-elles jouer ce rôle. de barrière ? Nous avons vu que, sur sable, les racines de maïs et tournesol accumulaient en abondance, à 21 j de culture, de la matière active à l'extérieur mais qu'avec le temps (T 35 j) cette quantité se retrouvait majoritairement à l'intérieur (+ de 80%). Il s'agit en fait d'une adsorption momentanée d'une matière active lipophile qui s'accumule sur un espace racinaire et qui, à la vitesse de la partition/diffusion, pénètre peu à peu dans l'espace vivant.

A l'aide de l'aclonifen radioactif nous avons pu mettre en évidence que celui ci entre dans les plantes aussi bien par les parties souterraines que foliaire. Les concentrations internes sont très variables. Une voie d'entrée importante en pré-levée est le système racinaire s'il est en contact avec la zone traitée. Dans une expérience sans contact racinaire, l'hypocotyle de tournesol est à 26 μM , les feuilles à 1 μM , les racines à 0. Cela signifie que toutes les parties souterraines jeunes sont en situation d'adsorber le pesticide s'il y a contact avec la matière active. Mais cela ne signifie pas obligatoirement qu'il y a transfert massif vers le haut de la plante. Sur sable traité dans la totalité (la plus grande disponibilité possible de l'aclonifen en pré-levée du tournesol) la concentration racinaire grimpe à 370 μM pour 25 μM dans les feuilles (cette dernière concentration est à la limite d'induire de la phytotoxicité dans des plantes sensibles). Si le sable est remplacé par un mélange terre/terreau/sable, la concentration racinaire chute à 165 μM . La situation est assez semblable avec le maïs cultivé sur le même substrat : concentration racinaire = 310 μM et concentration foliaire dans la 1^{ère} feuille 45 μM soit une concentration suffisante pour expliquer la phytotoxicité observée dans certaines conditions de culture (concentration dans F1 pour du maïs cultivé sur sable 50 μM). Les plus

fortes concentrations racinaires et foliaires dans le maïs (comparé au tournesol) sur ce substrat terre/terreau/sable s'expliquent, à notre avis, par un chevelu racinaire plus important chez la maïs.

Le système de chromatographie mis au point dans ce travail nous a permis de visualiser la présence *in vitro* et *in vivo* de métabolites plus polaires que l'aclonifen. C'est là probablement que se joue la sélectivité du tournesol et, pour une moindre part, du maïs vis-à-vis de l'aclonifen. 3 métabolites au moins sont retrouvés dans les racines de maïs. Ces métabolites présentent des spectres de DPE (pics à 305 et 385nm). Le métabolite majoritaire a un Rf 0. La situation est semblable avec les racines de tournesol : 2 spots polaires représentant la majorité du produit de départ (à eux deux ils représentent 79% de l'aclonifen de départ). Tout laisse penser que le spot à Rf 0 correspond à plusieurs produits non séparés par le système chromatographique. L'hydrolyse acide et basique de ce Rf 0 restitue l'aclonifen et pour une part un spot à Rf 0,8 qui pourrait correspondre à une forme hydroxylée de l'aclonifen.

Si l'apport d'aclonifen est foliaire (chez le tournesol) la concentration foliaire en herbicide est de 35 μ M à 48 h (suffisant pour tuer une plante sensible). L'extrait foliaire à ce temps de 48 h montre que 53% de la matière active a été métabolisée. Le produit transformé à un Rf 0 (polaire). Cette molécule polaire après hydrolyse acide et alcaline redonne un spot à Rf 0,9), celui de l'aclonifen.

Cette molécule polaire a été aussi obtenue *in vitro* par mélange d'un extrait enzymatique de feuille + du glutathion + de l'aclonifen. En 20h, 45% de l'aclonifen est transformé en un produit conjugué entre aclonifen et glutathion. L'utilisation d'un inhibiteur de GST renforce notre démarche tendant à dire qu'une des raisons de la résistance du tournesol et probablement du maïs concerne la présence dans les feuilles et dans les racines de ces deux plantes des GST qui reconnaissent l'aclonifen. Cela n'exclut pas d'autres mécanismes de détoxification. Enfin, malgré une activité GST racinaire et foliaire (mesurée avec le CDNB) plus forte chez le maïs que chez le tournesol tout indique que la métabolisation de l'aclonifen est plus efficace chez le tournesol.

CONCLUSION

Le travail présenté dans ce mémoire concerne la molécule d'aclonifen, herbicide de la famille chimique des diphenyléthers. Cette matière active synthétisée en 1977 a été décrite comme herbicide en 1983 (Buck et al., 1983). C'est donc une molécule déjà ancienne mais dont le mode d'action n'est pas parfaitement décrit jusqu'à aujourd'hui. En effet, la littérature scientifique ayant trait à cette molécule est très pauvre cela étant peut être lié au fait que cette matière active n'a pas eu un destin agronomique et commercial aussi grand que d'autres molécules concurrentes (Matringe et al, 1990 ; Trevisan et al., 1999, Vischetti et al., 2002). Les premiers effets herbicides décrits indiquent que la cible atteinte par l'aclonifen était située dans les feuilles et que le succès herbicide était largement assuré sur des plantules, c'est-à-dire lorsque l'espace cible est de petite taille en train de se mettre en place. Sur des plantes très développées le succès herbicide devient nettement plus difficile à obtenir. Ces constatations orientent bien évidemment la formulation de la matière active et le mode de traitement. Sur des plantules en sortie de la phase de germination et en début de production du système foliaire cible, le plus sûr moyen d'atteindre son but est le traitement de prélevée avec une matière active formulée en poudre mouillable ou en suspension concentrée (Devine et., 1993 ; Balke et Price., 1988) Toutes ces conditions sont remplies dans la formulation Challenge 600 commercialisée par Bayer CropScience.

A) Pouvoir herbicide de l'aclonifen, efficacité : une atteinte de processus vitaux à clarifier.

1) L'aclonifen : structure et mode d'action

Les grands diphenyléthers herbicides sont caractérisés certes par le noyau diphenylether mais aussi par un -COOH libre ou estérifié (acifluorfen, acifluorfen-méthyle, bifénox). Ces traits paraissent rendre possible l'atteinte spécifique de l'enzyme protoporphyrinogène-oxydase des chloroplastes mais aussi un mode de circulation dans les végétaux qui doit s'exprimer au stade plantule.

Structurellement, l'aclonifen diverge de ces diphenyléthers typiques par une substitution originale : nulle sur l'un des phényles, 2-Cl, 3-NH₂, 4 NO₂ sur l'autre, ce qui se traduit par une absence de pKa et une lipophilie élevée (log P ≥ 3,7). On peut s'étonner que, dans ces conditions, le même type d'activité herbicide soit maintenu, avec cependant une efficacité qui n'est pas la meilleure de sa famille chimique.

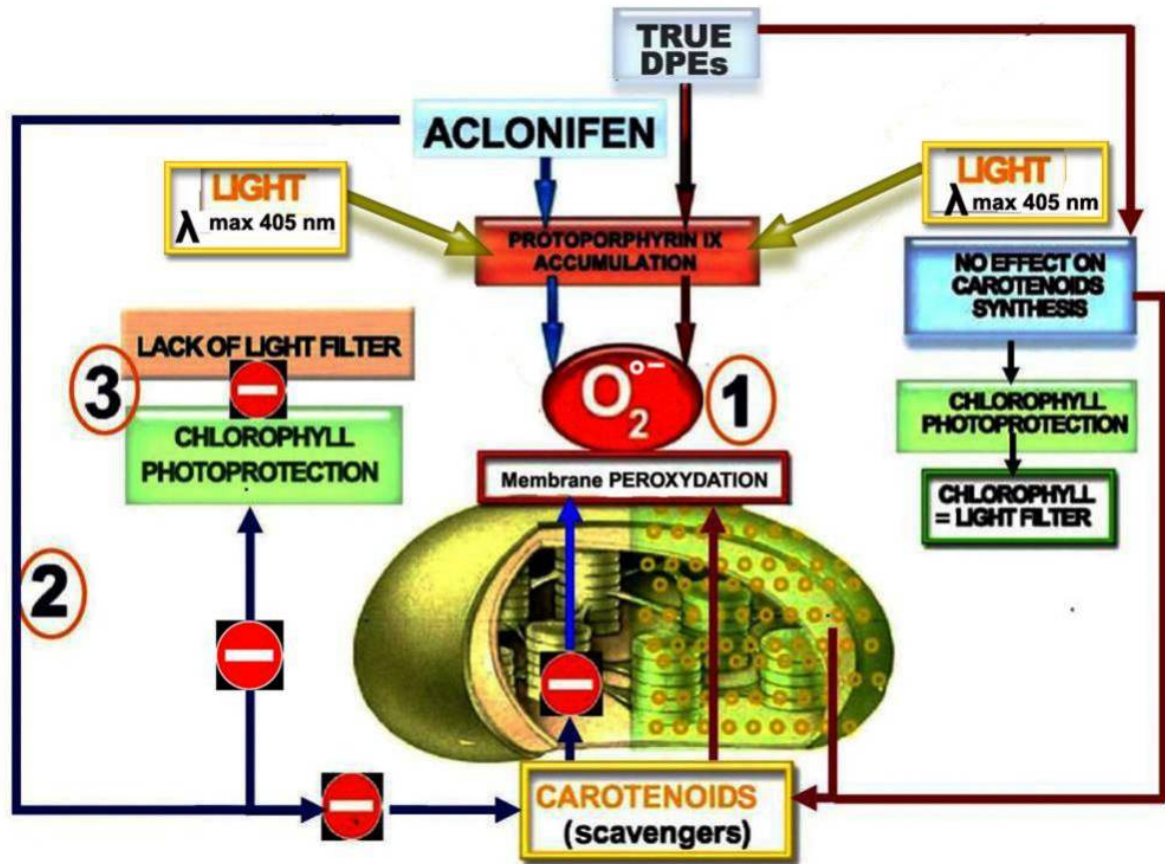
En revanche, cette molécule lipophile, se distribuant aisément dans les espaces membranaires est porteuse d'une seconde activité jusque là inconnue dans sa famille chimique, celle d'inhibiteur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Un détail structural attire attention : la présence du NH_2 en position 3 de l'un des phényles, qui rappelle le NH_2 de l'aminotriazole et le $-\text{NH}-$ du diflufénicanil ou du norflurazon.

Le trait le plus curieux est que les concentrations d'aclonifen nécessaires pour atteindre sévèrement chacune de ces deux cibles biochimiques sont très voisines alors que dans l'immense majorité des cas, il existe une cible principale, atteinte à une concentration au moins de dix à cent fois inférieure aux concentrations déclenchant des effets secondaires, par exemple chez les phénylcarbamates inhibiteurs de la division cellulaire.

2) Synergie, additivité, complémentarité ?

Bloquer en même temps deux cibles biochimiques à la même concentration, dans une même plante ne correspond pas forcément à un potentiel de destruction plus efficace. Dans le cas présent, plusieurs faits concourent pour envisager une complémentarité : les deux cibles sont localisées dans le même espace : les parties aériennes, et, de plus, dans le même organite : le chloroplaste.

Biochimiquement parlant, la photoexcitation de la protoporphyrine IX accumulée suite à l'action DPE, engendre des espèces radicalaires responsables d'une dégradation membranaire à laquelle s'opposeraient les caroténoïdes accumulés si leur synthèse n'avait pas été bloquée par le même herbicide. Il y a donc bien complémentarité d'action. Comment cela renforce-t'il l'action herbicide ? On peut concevoir que, dans ces conditions, il suffirait que l'aclonifen n'inhibe que partiellement la protoporphyrinogène oxydase, menant à des accumulations non massives de protoporphyrine IX. L'affaiblissement de la résistance membranaire due à la disparition des caroténoïdes rendrait ces membranes plus vulnérables vis-à-vis de l'effet DPE. Au plan pratique, on se rend compte, par exemple en examinant avec soin l'apparition des symptômes de deux points essentiels :



- Au cours de la vie d'une plante, les deux types d'effets peuvent se succéder : l'effet DPE ne s'exprime qu'à la lumière, dans des plantes qui ont émergé du sol. La biosynthèse des caroténoïdes, elle a commencé préalablement à l'obscurité.

- Si l'on considère la diversité biochimique et physiologique des adventices à détruire, on voit bien qu'il existe des sensibilités spécifiques vis-à-vis de l'une ou l'autre cible, aux différents stades de développement. Ainsi, un cotylédon de concombre, chargé de caroténoïdes et de chlorophylles reste t'il très sensible à l'effet DPE.

Ainsi, un effet DPE risque t'il de détruire, seul, une jeune plantule de vulpin alors que, plus tard, ce sera l'absence de caroténoïdes qui désorganisera l'appareil photosynthétique de feuilles plus âgées.

3) Concentration critique de l'herbicide aclonifen ?

Une importante part de ce travail expérimental a consisté à cerner les concentrations dans les parties aériennes qui correspondaient à l'apparition de symptômes de l'effet herbicide.

Cette démarche n'est pas évidente et nécessite d'éviter quelque pièges. Ainsi, l'apparition des nécroses consécutives à l'effet DPE dans les parties aériennes d'une plante accélère t-elle les pertes d'eau d'où il découle une augmentation artificielle de la concentration.

Le bilan global de ces mesures est que, au premier stade de développement des plantules d'espèces adventices du colza et du colza lui-même, les concentrations critiques herbicides sont très comparables. Il n'en va pas de même du tournesol où, du fait d'un scénario complexe, on ne parvient pas à atteindre cette concentration critique qui est probablement dix fois supérieure à la tranche des 30 à 60 μM qui est herbicide pour les autres espèces.

4) De l'application au champ à la concentration critique dans les parties aériennes :

L'obtention de la concentration critique herbicide dans l'espace cible des adventices est la résultante de plusieurs facteurs :

- a) L'application au champ au moment adéquat avec la stratégie adéquate (pré ou post levée) , la formulation convenable et la concentration appropriée.
- b) L'absorption par la plante, soit par voie racinaire (ce qui dépend d'un processus d'échange avec le sol) soit par la voie foliaire (ce qui dépend du comportement physico-chimique du pulvérisat).
- c) Le transfert de la surface de la plante vers l'espace-cible.
- d) La capacité du produit accumulé dans l'espace cible à s'y maintenir pendant le temps nécessaire à la destruction de l'adventice. Ce critère est majoritairement dépendant d'existence d'une capacité métabolisante. Nous avons tenté d'évaluer la relation quantitative existant entre concentration critique dans l'espace cible ($[C]_c$) et la concentration dans le sol ($[C]_s$) permettant d'obtenir cette $[C]_c$ après un traitement de prélevée. On a constaté que, dans ces conditions, l'obtention de $[C]_c$ dans les feuilles correspondait à une concentration dans les racines $[C]_R$ qui pouvait être supérieure à $[C]_c$ (cas de plantes non transpirantes) ou inférieure à $[C]_c$ (plantes transpirantes). On peut donc chiffrer la valeur du paramètre de transfert T tel que

$$T = \frac{[C]_R}{[C]_c}$$

Par ailleurs, la concentration $[C]_R$ dépend du stock de herbicide dans la sol $[C]_s$. On a donc vu paramètre d'absorption A tel que

$$A = \frac{[C]_s}{[C]_R}$$

Pratiquement la concentration critique dans le sol $[C]_s$ doit être définir par l'équation

$$[C]_s = [C]_c \times T \times A$$

Références

Cette démarche présente de l'intérêt au stade plantule et en absence d'aptitude métabolique vis-à-vis de l'herbicide.

Dans le cas (tournesol, par exemple) la formule doit tenir compte d'un potentiel de métabolisation (**M**) qui doit s'ajouter à l'équation.

$$[C]_s = [C]_c \times T \times A \times M$$

De plus, à un stade de développement plus avancé (qui se situe normalement hors de la durée critique considérée comme la durée d'efficacité du traitement appliqué au champ), on a vu, chez le tournesol, que la situation pouvait se compliquer considérablement avec un axe hypocotylé très perméable et une immobilisation racinaire de l'herbicide très importante. Malgré ces limites, cette équation simple permet « d'encadrer » les différences de sensibilité des espèces végétales vis-à-vis d'un traitement de prélevée.

Nous avons déjà indiqué que la littérature scientifique concernant l'aclonifen était peu fournie. En particulier, le mode d'action n'était pas clairement décrit. Pour avoir vocation à être un herbicide une molécule doit remplir un certain nombre de conditions : 1) être capable de bloquer une cible biochimique d'importance majeure au sein d'un végétal, 2) bloquer 100% de ces cibles biochimiques en même temps, et, 3) bloquer ces cibles suffisamment longtemps pour que le blocage de la cible induise un dysfonctionnement physiologique létal. Cela sous-entend qu'à partir d'un traitement effectué à la surface du sol, la matière active soit chimiquement stable (les adventices ne germent pas toutes au même moment), peu entraînable dans l'eau (la pluie peut entraîner la matière active en dehors des zones du sol où se trouvent les semences et le système racinaire), et suffisamment mobile dans le végétal pour assurer dans les feuilles un transfert vers le haut conduisant à une concentration critique rendant possible le blocage total et prolongé de toutes les cibles visées (Devine, 1989 ; Balk et Price., 1988).

Avec l'aclonifen, à travers un certain nombre de tests de laboratoire, nous avons identifié non pas un mais deux modes d'action par atteintes de deux cibles biochimiques situées dans le même organe : la feuille et dans le même organite : le chloroplaste. Les deux voies métaboliques essentielles bloquées par cet herbicide sont d'une part la biosynthèse des chlorophylles (molécules essentielles pour la capture d'énergie solaire et l'acte photosynthétique), d'autre part la biosynthèse des caroténoïdes, pigments lipophiles membranaires servant à une collecte d'énergie solaire supplémentaire et à la protection de la chlorophylle excitée) (Kilinc et al., 2009)

La mise en évidence de l'effet sur la biosynthèse de la chlorophylle, cible de la famille des diphényléthers avec comme tête de file l'acifluorfen-Me ou le bifénox, s'effectue classiquement sur un matériel ultra-sensible : le cotylédon chlorophyllien de concombre. Cet effet herbicide n'est visible qu'en présence de lumière visible. Le blocage de la voie enzymatique par les diphényléthers génère en fin de compte, à la lumière, des ions superoxydes à l'origine de nécroses foliaires. Ces nécroses sont à la mesure du flux lumineux reçu. Nous avons vu sous serre, des feuilles « brûler » en quelques heures (Witkowski et Halling, 1989). La mise en évidence du blocage de la voie des caroténoïdes peut s'effectuer aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. La référence du blocage d'une telle voie métabolique est le norflurazon dont la structure chimique n'a rien à voir avec celle de l'aclonifen. La conséquence du blocage de cette voie de biosynthèse des isoprénoïdes est un arrêt de la pigmentation orangée observable sur des plantules étiolées, et pour des plantules cultivées à la lumière c'est l'apparition de feuilles toutes blanches (sans la présence de caroténoïdes dans la membrane du thylacoïde la chlorophylle excitée par la lumière est détruite). C'est un phénomène classiquement appelé « bleaching » correspondant à l'apparition de nouvelles feuilles complètement blanches (Bartels and Watson, 1978 ; Dahlin et Ryberg, 1986 ; Albrecht et Sandmann, 1994 ; Baccio et al., 2002)

Ainsi, le mode d'action de l'aclonifen est lié au blocage de deux enzymes agissant dans des processus séparés : la synthèse des chlorophylles d'une part et la synthèse des caroténoïdes d'autre part. Les deux cibles biochimiques sont, la protoporphynogène oxydase avec génération d'ions superoxyde, et la phytoène désaturase. A la lumière de nos expérimentations nous pouvons dire que les blocages de ces enzymes se déroulent à des concentrations internes foliaires quasiment identiques. Nous avons déjà rencontré au laboratoire des molécules ayant deux cibles biochimiques d'action, mais dans ce cas les deux cibles étaient bloquées pour des concentrations très différentes, ce qui dégageait une cible majoritaire qui était celle donnant l'effet (Bartels et Hilton, 1973 ; Macherel et al., 1986a et 1986b).

A notre connaissance l'aclonifen est la seule matière active connue jouant en même temps le rôle de deux matières actives.

5) Variations des effets physiologiques liés à l'emploi de l'aclonifen :

Le mode d'action décrit ci-dessus s'applique t-il à tout type de plantes ? Si tel était le cas l'aclonifen serait commercialisé comme herbicide total et peut être aussi utilisé dans de rares cultures en jet dirigé (ex. la vigne).

Nous avons aussi montré que la concentration interne foliaire entraînant un blocage total de la synthèse des pigments n'était pas obligatoirement identique d'une espèce à l'autre. Parmi les espèces que nous avons étudiées nous avons noté des différences suivantes :

- quatre espèces réagissent fortement (dose inférieure à la dose agronomique) : colza, moutarde blanche, vulpin, laitue,
- la majorité réagit complètement à la dose agronomique : blé, maïs, vulpin, oxalis, chiendent, luzerne, moutarde sauvage,
- la carotte, assez largement insensible dans le compartiment foliaire mais développe des racines dépigmentées (sans conséquences physiologiques),
- trois espèces insensibles aux doses agronomiques : morelle noire, prêle, tournesol.

On peut, aussi avoir de même faire cette démarche avec des traitements foliaires de postlevée et on a vu que les coefficients de pénétration foliaire en conditions standard pouvaient subir des variations fortes, ici, du simple ou double entre colza et tournesol par exemple.

L'ensemble des mesures ainsi réalisées a permis d'établir qu'avec l'aclonifen dans sa formulation Challenge 600, il n'existait pas d'espace de sélectivité entre colza et ses adventices au contraire du tournesol qui, lui présentait une forte résistance à cet herbicide.

La dernière observation sur le double mode d'action lié à l'emploi de l'aclonifen est que les deux effets ne sont pas obligatoirement exprimés. En effet, l'apparition de nécroses liées à un blocage de la protoporphyrinogène oxydase ne peut se réaliser qu'en présence de lumière, l'étendue des nécroses étant reliée à l'énergie reçue. Tel n'est pas le cas de l'autre blocage. Ainsi, sous lumière faible, il est possible que seul le «bleaching» s'exprime. Cette remarque n'a probablement pas lieu d'être sur le terrain où la lumière solaire apparaît toujours suffisante pour induire les nécroses.

6) L'intérêt agronomique de l'aclonifen – Eventail des cultures :

Les principales cultures pour lesquelles l'aclonifen est homologué en France sont la féverole d'hiver et de printemps, le pois protéagineux d'hiver et de printemps, le tournesol, la lentille, la pomme de terre, le maïs, le tabac, diverses plantes de maraîchage. Les doses d'emploi vont de 2,7 kg/ha à 1,2 kg/ha. Cette variation des doses à l'hectare indique aussi que dans les espèces qui nous n'avons pas utilisé, des comportements, des tolérances sont plus ou moins fluctuants en fonction des espèces.

Nous avons particulièrement étudié à la demande de notre partenaire industriel, le comportement de deux cultures vis-à-vis de l'aclonifen : le colza et le tournesol.

Dans le cas du colza il s'agissait d'essayer de trouver un espace de sélectivité pour l'aclonifen entre la culture et ses adventices en sachant qu'en prélevée classique la culture est détruite

(plante trouvée très sensible). Nous avons effectué et comparé différents traitements : prélevée classique, prélevée avec semis hors de la zone contaminée par l'herbicide, post-levée précoce, post-levée tardive avec la formulation Challenge 600 adaptée à la prélevée. Les résultats ne nous ont pas permis de trouver la moindre marge de sélectivité du colza vis-à-vis de l'aclonifen. Malgré la formulation utilisée, le fort log P de l'aclonifen (4,37 dans le dossier d'homologation, 3,7 pour nos mesures) de l'aclonifen, la cuticule épaisse du colza, les traitements effectués à des stades physiologiques très différents, aucune marge de sélectivité n'a été dégagée. Si l'on cherche absolument une situation d'emploi de l'aclonifen, il ne reste que deux solutions à explorer : 1) l'apport par pelliculage de semences d'un safener déclenchant chez le colza l'induction d'un mécanisme de détoxification situé de préférence dans les systèmes racinaires, 2) la modification des cibles biochimiques qui deviendraient par mutation insensibles à l'herbicide.

L'étude sur la relation aclonifen/tournesol correspond à une autre demande de Bayer CropScience. En effet, le tournesol est une culture qui supporte l'aclonifen aussi bien en traitement classique de prélevée qu'en traitement de post-levée. Il s'est agit d'expliquer comment et pourquoi cette culture supporte ce diphényléther.

A l'aide de l'aclonifen ^{14}C nous avons pu suivre en cinétique le devenir de l'aclonifen (à la dose agronomique) aussi bien après un traitement de prélevée qu'après un traitement de post-levée. Dans les deux cas, la métabolisation de l'aclonifen est rapide et efficace : dans les racines de 5 semaines après un traitement de prélevée, il ne reste que 10% d'aclonifen, le reste correspond à au moins 3 métabolites polaires en cours d'identification. Dans les feuilles, suite à un traitement de post-levée, en 48h, plus de 80 % de la matière active sont transformés en des molécules plus polaires que le produit de départ (identification en cours). Dans les deux cas les métabolites obtenus, dont certains vont probablement jusqu'à la formation de composés conjugués avec des sucres mais aussi avec le glutathion, conduisent à des structures moléculaires dont la polarité et peut être l'encombrement stérique empêchent la relation aux deux cibles biochimiques atteintes par la molécule mère. Un stockage vacuolaire des formes les plus hydrophiles n'est pas à exclure, celui-ci interdirait par compartimentation un accès aux cibles chloroplastiques de l'aclonifen.

Ainsi, la différence très grande de réaction à la présence d'aclonifen observée entre le colza et le tournesol est une illustration de la biodiversité biochimique et fonctionnelle. Cette biodiversité existe bien évidemment aussi au niveau des plantes adventices.

En fait, cette biodiversité peut s'exprimer par la présence ou l'induction d'activités métaboliques de détoxification ou, plus rarement, par mutations des cibles biochimiques (ce

type de mutation a par exemple été observé avec le chénopode blanc et l'amarante dans les champs de maïs traités avec l'atrazine).

Ainsi, pour des raisons de biodiversité enzymatique, le tournesol présente des capacités de métabolisation de l'aclonifen aussi bien au niveau racinaire que foliaire. De telles capacités métaboliques n'existent pas chez le colza.

7) La sélectivité du tournesol vis-à-vis de l'aclonifen :

Ce travail a démontré l'énorme capacité des racines et des parties aériennes du tournesol à inactiver l'aclonifen en le conjuguant avec un motif hydrophile qui est probablement le glutathion, mais la possibilité de glycosylation n'est pas exclue. Cette capacité serait, en soi, suffisante pour expliquer une bonne part de la sélectivité observée. Il faut, cependant compléter cette observation par 3 éléments complémentaires dont nous avons montré l'importance quantitative :

- a) Il existe au niveau des racines de tournesol une capacité d'immobilisation superficielle de l'aclonifen qui est très forte. Ceci se traduit par un rapport quantité d'herbicide transporté vers les feuilles/quantité racinaire qui est très faible.
- b) En prélevée, l'aclonifen reste adsorbé à la surface du sol alors que le tournesol développe une racine pivotante profonde qui n'absorbera presque pas d'herbicide.
- c) Le moteur transpiratoire qui fait monter l'herbicide dans les feuilles est fort chez le maïs, mais faible chez le tournesol.

8) Un métabolisme spécifique du tournesol ?

L'existence commerciale de l'aclonifen doit sans doute beaucoup à l'existence de cet intense métabolisme, chez cette culture. Beaucoup reste encore à faire sur ce sujet passionnant pour un physiologiste. Si le responsable de la métabolisation est bien une GST (ce que nous vérifions actuellement), celle-ci est-elle structurelle ou inductible ? L'aclonifen lui-même pourrait-il jouer le rôle d'inducteur, comme il semble le faire pour certaines isoformes de GST chez le maïs ? Le ou les gènes responsables de la production de cette enzyme pourraient-ils être clonés et être exprimés chez d'autres espèces cultivées ?

Ce ou ces gènes existent-ils aussi chez d'autres espèces de plantes, susceptibles du devenir, ainsi, des majeurs adventices du tournesol désherbé à l'aclonifen (cas de *Solanum nigrum*) ? Pratiquement, il faut sans doute d'interroger déjà sur la possible capacité métabolisante d'*Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae).

9) Faut-il formuler différemment l'aclonifen?

L'ensemble de ce travail a porté sur l'aclonifen soit pur soit formulé sommairement avec du DMSO, soit inclus dans la formulation commerciale du Challenge 600.

Celle-ci, bien que confidentielle, ne peut sans doute pas déroger aux règles générales d'une formulation de prélevée (suspension concentrée) avec présence de tensio-actifs assurant la stabilité de la bouillie diluée et le contact avec le sol, présence d'additifs antigel, antimousse, éventuellement antioxydants.

Cette formule a démontré qu'elle assurait une pénétration bien plus forte que le DMSO 1% au niveau racinaire, mais aussi, plus remarquablement, au niveau foliaire, ce qui plaiderait en faveur de la présence de solvants lipophiles stables dans la formulation.

Peut-on faire mieux ? En prélevée, l'énorme sélectivité du tournesol permet sans doute certains progrès pouvant concerner par exemple l'adjonction de tensio actifs différents ou d'huiles qui pourraient élargir le spectre d'efficacité sur adventices.

En postlevée, là aussi, l'énorme résistance du tournesol à l'aclonifen pourrait autoriser une action avec des concentrés émulsionnables malgré une baisse possible de l'intervalle de sélectivité.

10) Résilience de l'aclonifen. Impact environnemental :

Une approche du devenir environnemental de l'aclonifen est maintenant possible à la lumière de quelques unes de nos expérimentations. En effet, il est de la responsabilité des collectivités territoriales, des pouvoirs publics, des utilisateurs et des industriels de mesurer et de comprendre les processus de dissipation des pesticides homologués. C'est un souhait de la Société actuelle d'être sécurisée vis-à-vis de molécules qui peuvent être potentiellement présentes dans l'eau, l'air, les sols, les aliments. Répondre à ces interrogations est raisonnable. L'aclonifen est classiquement utilisé à 2,7 kg/ha. Une marge de temps acceptable de dissipation totale de la matière active au champ semble être l'année. La situation idéale de dissipation reste la minéralisation totale de cette molécule organique sous forme de CO₂, H₂O, NH₄⁺... La situation du terrain n'est pas aussi idyllique mais nos résultats apportent plusieurs éléments positifs de réflexion.

– Une faible mobilité de l'aclonifen dans le sol a été maintes fois observée (analyse des carottages : comptages de radioactivité et autoradiographies), eau de drainage (rare) des cultures non radioactive, notre travail et ceux de Trevisan et al., 1999 ; Vichetti et al., 2002 ; Garratt et al., 2002 vont dans le sens d'une très faible mobilité.

– Une transformation progressive de la matière active par le type de sol utilisé. A T 35j d'incubation sol/aclonifen, 16% de la dose agronomique appliquée sont retrouvés sous forme

de $^{14}\text{CO}_2$ dans un piège à potasse, ce qui indique la possibilité d'ouverture du cycle aromatique substitué de l'aclonifen marqué. Le cycle phényle (marqué au ^{14}C) est non seulement ouvert mais oxydé en CO_2 . Il semble que certainement souches bactériennes du genre *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Sphingomonas* soient en situation de dégradation les DPE (Niki et Kuwatsuka, 1976 ; Ohyam'a and Kuwatsuka, 1983 ; Liang, 2009 ; Schauer et al., 1995 ; Kale et al., 1997).

– La vitesse de dégradation de l'aclonifen dans le sol choisi n'est pas négligeable. A 120 j d'incubation nous avons détecté un minimum de 6 métabolites identifiés (encore toxiques ?) : 4 phénols (un mono et 3 di-hydroxylés), et une structure ouverte en C6 avec 2 fonctions carboxyliques. A cette date (120 j) des structures DPE semblent absentes, plusieurs structures benzéniques et phénoliques sont présentes. Une structure provenant d'un phényle est ouverte ce qui donne à notre avis une possibilité de minéralisation totale.

B) Réflexion générale :

Dans la lutte chimique contre les mauvaises herbes il y a, comme dans la recherche de certains nouveaux médicaments, une fuite en avant liée à la révélation par les traitements de lignées d'adventices résistantes issues de la biodiversité naturelle. Il faut en permanence innover sur des cibles biochimiques de plus en plus pointues tant les mécanismes de résistance de la culture à telle ou telle molécule, se retrouvent dans les adventices associés à cette culture. En un mot, les espaces de sélectivité culture/adventice deviennent au cours du temps de plus en plus faibles.

Les nouvelles molécules découvertes durant les 20 dernières années telles les sulfonylurées sont très efficaces et ont l'avantage environnemental d'être utilisées à des doses faibles. Ce n'est pas pour autant la panacée car on s'est rendu compte que les risques sur culture n'étaient pas nuls et que très rapidement un cortège d'adventices résistants étaient détectées dans les champs. L'apparition de résistances avec l'emploi de nouveaux insecticides et fongicides est encore plus criante et la fuite en avant encore plus dramatique car pour ces deux types d'organismes ciblés les renouvellements de génération sont très largement plus rapides que chez les plantes.

Ainsi, l'emploi d'une molécule comme l'aclonifen, dont les doses agronomiques sont certes élevées, présente quelques avantages non négligeables :

- deux sites d'action indépendants atteints pour des concentrations critiques très proches interdisant pratiquement l'apparition d'adventices ayant ses deux cibles mutées,
- la propriété de ne pas former en masse des résidus liés au complexe argilo-humique,
- et,

Références

- la propriété d'être métabolisée au moins dans nos conditions jusqu'à l'ouverture des cycles benzéniques et jusqu'au CO₂.

Ainsi, pour nous, l'emploi de l'aclonifen doit être considéré avec le plus grand soin tant son rapport bénéfice/risque plaide en sa faveur. .

REFERENCES

1. Amrhein N., Schab J., and Steinrücken, H. C. (1980) The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften*. 67, 356.
2. Andersson P. O., Takaichi S., Cogdell R. J. and Gillbro T., (2001) Photophysical Characterization of Natural cis-Carotenoids. *Photochem Photobiol.* 74 (4) 549-557.
3. Andrews C. J., Cummins I., Skipsey M., Grundy N.M., Jepson I., Townson J., and Edwards, R. (2005) Purification and characterisation of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.) selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. *Pestic Biochem Physiol.* 82, 205.
4. Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
5. Baccio D. D., Quartacci M. F., Vecchia F. D., Rocca N. L., Rascio N. and Navari-Izzo F., (2002) Bleaching herbicide effects on plastids of dark-grown plants: lipid composition of etioplasts in amitrole and norflurazon-treated barley leaves. *Exp Bot* 53 1857-1865.
6. • Bakir A., M., Ashour, N. I., El-Basyouni, S. Z., and Sayed, A. M. (1976) Response of the photosynthetic apparatus of corn (*Zea mays*) to presowing seed treatment with gamma rays and ammonium molybdate. *Environ Exp Bot.* 16, 217
7. Balke N. E., and Price T. P. (1988) Relationship of lipophilicity to influx and efflux of triazine herbicides in oats roots. *Pestic. Biochem. Physiol.* 30; 228-237
8. Bartels, P.G., and J.L., Hilton. (1973). Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham and colchicine treatments on microtubules. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3:462-472
9. BayerCropScience (2007) Challenge 600. www.bayercropscience.fr
10. Becerril, J., and Duke, S.O. (1989) Acifluorfen effects on intermediates of chlorophyll synthesis in green cucumber cotyledon tissues. *Pestic Biochem Physiol.* 35, 119.
11. Böhm, F., Edge, R., Foley, S., Lange, L., and Truscott, T. G. (2001) Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiol B: Biology* 65, 177.
12. • Breitenbach J., Böger P. and Sandmann G., (2002) Interaction of bleaching herbicides with the target enzyme [zeta]-carotene desaturase. *Pestic Biochem Physiol* 73 (2) 104.
13. Breitenbach J., Zhu C. and Sandmann G., (2001) Bleaching Herbicide Norflurazon Inhibits Phytoene Desaturase by Competition with the Cofactors. *Agric Food Chem.* 49 (11) 5270.
14. Brendstrup I., and Kloster I., (1998) FENIX (aclonifen): a novel herbicide for use in carrot, parsley, (parsley root), parsnip, celery, set onion green peas and potatoes; 15. Danish Plant Protection Conference: Pests and Diseases, Foulum (Denmark).
15. Buck W., Friedlander H., Linden G., and Schneider G., (1983) A new pre-emergence herbicide. In 10th International Congress of Plant Protection. ICPP Vol.1, 2C-S3 307-314.
16. Burrows H. D., Canle L, M., Santaballa, J. A., and Steenken, S. (2002) Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Photochem Photobiol B: Biology.* 67, 71.
17. Cabanne F., and Gaudry J.C. (1995) Action combinée de l'aclonifen et de la bentazone administrés avec ou sans formulation. *Agronomie* 15, 593-607
18. Cantamutto M., and Poverene M. (2007) Genetically modified sunflower release: Opportunities and risks. *Field Crops Research* 101, 133.
19. Casida J. E. (2009) Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chemical Research in Toxicology* 22, 609.

20. Chauvel, B., Guillemin, J. P., Colbach, N., and Gasquez, J. (2001) Evaluation of cropping systems for management of herbicide-resistant populations of blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Crop Protection* 20, 127.
21. Cherifi M., Raveton M., Picciocchi A., Ravanel P., and Tissut M. (2001) Atrazine metabolism in corn seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 39, 665.
22. Chollet D., Mircovich C. ; Pilorge E., (1998) La lutte contre L'ambrosie dans les cultures de Tournesol. *Phytoma*. La défense des végétaux, N°: 504.
23. Colbach, N., Chauvel, B., Gauvrit, C., and Munier-Jolain, N. M. (2007) Construction and evaluation of *Alopecurus myosuroides* modelling the effects of cropping systems on the blackgrass life-cycle: From seedling to seed production. *Ecological Modelling* 201, 283.
24. • Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2, 144.
25. Cortet, J., Griffiths, B. S., Bohanec, M., Demsar, D., Andersen, M. N., Caul, S., E. Birch, A. N., Pernin, C., Tabone, E., de Vaufléury, A., Ke, X., and Henning Krogh, P. (2007) Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia* 51, 207.
26. Damià Barceló and Marie-Claire, H. (1997) Subject index. In Techniques and Instrumentation in *Analytical Chemistry* Vol. 19 p. 519, Elsevier.
27. Daniell, H., and Rebeiz, C. A. (1982) Chloroplast culture VIII a new effect of kinetin in enhancing the synthesis and accumulation of protochlorophyllide. *Biochem Biophys Res Com.* 104, 837.
28. De Schampheleire, M., Spanoghe, P., Brusselman, E., and Sonck, S. (2007) Risk assessment of pesticide spray drift damage in Belgium. *Crop Protection* 26, 602.
29. De Smet, B., Claeys, S., Vagenende, B., Overloop, S., Steurbaut, W., and Van Steertegem, M. (2005) The sum of spread equivalents: a pesticide risk index used in environmental policy in Flanders, Belgium. *Crop Protection* 24, 363.
30. De Wilde, T., Spanoghe, P., Ryckeboer, J., Jaeken, P., and Springael, D. (2009) Sorption characteristics of pesticides on matrix substrates used in biopurification systems. *Chemosphere* 75, 100.
31. Del Buono D., Micheli M., Scarponi L., and Standardi A. (2006) Activity of glutathione S-transferase toward some herbicides and its regulation by benoxacor in non-embryogenic callus and in vitro regenerated tissues of *Zea mays*. *Pestic Biochem Physiol.* 85, 61.
32. Devine, M., Duke, S. O., and Fedtke, C. (1993) Physiology of Herbicide Action. Prentice Hall, New Jersey, USA.
33. Di Ilio C., Sacchetta, P., Iannarelli V., and Aceto A. (1995) Binding of pesticides to alpha, mu and pi class glutathione transferase. *Toxicol Lett.* 76, 173.
34. Diesperger H., and Sandermann H. (1979) Soluble and microsomal glutathione S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta* 146, 643.
35. Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 258.
36. Dodds, G. T., Ashtakala, S. S., Lamoureux, S. W., and Lester, P. (1993) Effects of [delta]-aminolevulinic acid and 3-amino-1,2,4-triazole on carotenoid accumulation. In *Methods in Enzymology* Vol. 214 p. 348, Academic Press.
37. Duke, S. O., Vaughn, K. C., and Meeusen, R. L. (1984) Mitochondrial involvement in the mode of action of acifluorfen. *Pestic Biochem Physiol.* 21, 368.
38. Edwards R., and Dixon D.P. (2005) Plant Glutathion Transferases. *Methods in Enzymology* 401, 169-175.
39. Edwards, R., Dixon, D. P., and Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trend Plant Sci.* 5, 193.

40. Edwards, R., Dixon, D. P., Sies, H., and Lester, P. (2005) Plant Glutathione Transferases. In *Methods in Enzymology* Vol. 401 p. 169, Academic Press.
41. Egaas, E., Sandvik, M., Fjeld, E., Källqvist, T., Goksøyr, A., and Svensen, A. (1999) Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Compar Biochem and Physiol. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122, 337.
42. Ensminger, M. P., and Hess, F. D. (1985) Action Spectrum of the Activity of Acifluorfen-methyl, a Diphenyl Ether Herbicide, in *Chlamydomonas eugametos*. *Plant Physiol.* 77, 503-505.
43. Ferhatoglu, Y., Avdiushko, S., and Barrett, M. (2005) The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. *Pestic Biochem Physiol.* 81, 59.
44. Fernández-Alba, A. R., and García-Reyes, J. F. (2008) Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *TrAC Trend Analytical Chemistry.* 27, 973.
45. Forney D. R. (2009) Importance of Pesticides in Integrated Pest Management. In *Pesticides: Managing Risks and Optimizing Benefits* p. 174, American Chemical Society, Washington, DC.
46. Frear D. S., and Swanson, H. R. (1973) Metabolism of substituted diphenylether herbicides in plants. I. Enzymatic cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum sativum* L.). *Pestic Biochem Physiol.* 3, 473.
47. Frear DS, Swanson HR, and Mansanger ER., (1991) Acifluorfen metabolism in soybean: Diphenylether bond cleavage and the formation of homoglutathione, cysteine, and glucose conjugates. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 299-310.
48. Frear DS, Swanson HR, Thalacker FW (1991) Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron, and linuron in wheat. *Pestic Biochem Physiol* 41:274–287.
49. Gasquez J., (1981) Evolution de la résistance aux triazines chez les espèces annuelles: la résistance chloroplastique. *Compte Rendu 11ème Conférence COLUMA*, Tome IV, 981-1008.
50. Gaultier, J., Farenhorst, A., Cathcart, J., and Goddard, T. (2008) Degradation of [carboxyl-14C] 2,4-D and [ring-U-14C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content. *Soil Biol and Biochem.* 40, 217.
51. Gertsch, J., Enna, S. J., and David, B. B. (2007) Glutathione-S-Transferase. In *Pharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* p. 1, Elsevier, New York.
52. Gonzalez, M. P., Diaz, H. G., Ruiz, R. M., Cabrera, M. A., and Ramos de Armas, R. (2003) TOPS-MODE Based QSARs Derived from Heterogeneous Series of Compounds. Applications to the Design of New Herbicides. *Chem Information Computer Sciences.* 43, 1192.
53. Gronwald, J. W., and Plaisance, K. L. (1998) Isolation and Characterization of Glutathione S-Transferase Isozymes from Sorghum. *Plant Physiol.* 117, 877-892.
54. Guddewar, M. B., and Dauterman, W. C. (1979) Purification and properties of a glutathione-S-transferase from corn which conjugates s-triazine herbicides. *Phytochem.* 18, 735.
55. Guengerich, F.P., and Martin, M.V. (2006) Purification of Cytochromes P450. In *Cytochrome P450 Protocols* p. 31.
56. Halusková L.U., Valentovicová K., Huttová J., Mistrík I., and Tamás L. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol Biochem.* 47, 1069.

57. Hatton, P. J., Cole, D. J., and Edwards, R. (1996) Influence of Plant Age on Glutathione Levels and Glutathione Transferases Involved in Herbicide Detoxification in Corn (*Zea mays*L.) and Giant Foxtail (*Setaria faberi*Herrm). *Pestic Biochem Physiol* 54, 199.
58. Heap I., (2007) - The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet.
59. Hill D. S. (2008) Pest damage to crop plants. In *Pests of Crops in Warmer Climates and their control* p.59. Publisher: Springer, ISBN: 1402067372, 750 p.
60. Hoffmann, A., Hammes, E., Plieth, C., Desel, C., Sattelmacher, B., and Hansen, U. P. (2005) Effect of CO² supply on formation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*. 227, 3.
61. <http://compendium.bayercropscience.com/BAYER/CropScience/CropCompendium/BCS/CropComp.nsf/id/aclonifen.htm?open&ccm=300020>.
62. <http://www.uipp.org>.
63. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/fr/Reports/15>.
64. http://www.cetiom.fr/fileadmin/cetiom/kiosque/brochures_tournesol/brochuresTO2010/TOnord2010/desherbage_TO_nord2010.pdf.
65. <http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx> Classification of Herbicides According to Mode of Action.
66. Hu, W., and Haddad, P. (2000) Adsorption behaviour of zwitter ionic surfactants onto a reversed-phase stationary phase. *Chromatographia*. 52, 543.
67. Hwang, I. T., Hong, K. S., Choi, J. S., Kim, H. R., Jeon, D. J., and Cho, K. Y. (2004) Protoporphyrinogen IX-oxidizing activities involved in the mode of action of a new compound N-[4-chloro-2-fluoro-5- 3-(2-fluorophenyl)-5-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl-methoxy -phenyl]-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide. *Pestic Biochem Physiol*. 80, 123.
68. Irzyk, G. P., and Fuerst, E. P. (1993) Purification and Characterization of a Glutathione S-Transferase from Benoxacor-Treated Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol*. 102, 803-810.
69. Ishaaya, I., Degheele, D. and Ishaaya, I. (1998) *Insecticides with Novel Modes of Action: Mechanisms and Application*. Publisher Springer. ISBN: 3540630589.
70. Jacobs, J. M., Jacobs, N. J., Sherman, T. D., and Duke, S. O. (1991) Effect of Diphenyl Ether Herbicides on Oxidation of Protoporphyrinogen to Protoporphyrin in Organellar and Plasma Membrane Enriched Fractions of Barley. *Plant Physiol*. 97, 197-203.
71. Jean Marc, R., Françoise, N., Patrick, R., and Michel, T. (1990) Effects of bifenox and oxadiazon on isolated chloroplasts, plant mitochondria and leaf pieces. *Pestic Sci*. 30, 149-158.
72. Judith, M. J., Peter, R. S., Nadia, G., Nicholas, J. J., Jacqueline, F. S., William, J. B., and Heidi, W. (1992) Effects of diphenyl ether herbicides on porphyrin accumulation by cultured hepatocytes. *Biochem Toxicol*. 7, 87-95.
73. Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., and Grimme, L. H. (2006) Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat Toxicol*. 76, 93.
74. Kale S.P., Murthy N.B.K. and Raghu K., (1997) Studies on Degradation of ¹⁴C-Nitrofen in Soils Under Moist and Flooded Conditions Using a Continuous Flow System in the Laboratory. *Bull Environ Contam and Toxic*. 59 (Number 1) 72-75.
75. Kamata, R., Shiraishi, F., Nishikawa, J.-i., Yonemoto, J., and Shiraishi, H. (2008) Screening and detection of the in vitro agonistic activity of xenobiotics on the retinoic acid receptor. *Toxicol in Vitro* 22, 1050.
76. Kennedy, G. Y., and Frederick, S. R. a. M. Y. (1979) *Pigments of Marine Invertebrates*. In *Advances in Marine Biology* Vol. Volume 16 p. 309, Academic Press.
77. Kenyon, W. H., Duke, S. O., and Vaughn, K. C. (1985) Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. *Pestic Biochem Physiol*. 24, 240.

78. Keum Y.S., Lee Y.J. and Kim J.-H., (2008) Metabolism of Nitrodiphenyl Ether Herbicides by Dioxin-Degrading Bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *Agric Food Chem* 56 (19) 9146.
79. Kilinc, Ö., Reynaud, S., Perez, L., Tissut, M., and Ravanel, P. (2009) Physiological and biochemical modes of action of the diphenylether acetonifene. *Pestic Biochem Physiol.* 93, 65.
80. Kmellár, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martínez-Uroz, M. A., Valverde, A., and Fernandez-Alba, A. R. (2008) Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatog. A* 1215, 37.
81. Köhne, J. M., Köhne, S., and Simunek, J. (2009) A review of model applications for structured soils: b) Pesticide transport. *Journal of Contaminant Hydrology.* 104, 36
82. Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrehelidze, D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Buadze, O., Zaalishvili, G., and Coulston, F. (2000) Organic Toxicants and Plants. *Ecotoxicol Environ Safety.* 47, 1.
83. Koski, V. M., French, C. S., and Smith, J. H. C. (1951) The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll a in normal and albino corn seedlings. *Arch Biochem Biophys* 31, 1.
84. Kouji, H., Masuda, T., and Matsunaka, S. (1989) Action mechanism of diphenyl ether herbicides; Stimulation of 5-aminolevulinic acid-synthesizing system activities. *Pestic Biochem Physiol.* 33, 230.
85. Kreuz K., Tommasini R. and Martinoia E., (1996) Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiol.* 111 (2) 349-353.
86. Krijt, J., Pleskot, R., Sanitrak, J., and Janousek, V. (1992) Experimental hepatic porphyria induced by oxadiazon in male mice and rats. *Pestic Biochem Physiol* 42, 180.
87. Krogh, P. H., Griffiths, B., Demsar, D., Bohanec, M., Debeljak, M., Andersen, M. N., Sausse, C., Birch, A. N. E., Caul, S., Holmstrup, M., Heckmann, L.-H., and Cortet, J. (2007) Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and Bt maize cropping systems. *Pedobiologia* 51, 219.
88. Kusumoto D., Chae S., Mukaida K., Yoneyama K., Yoneyama K., Joel D. and Takeuchi Y., (2006) Effects of Fluridone and Norflurazon on Conditioning and Germination of *Striga asiatica* Seeds. *Plant Growth Regul.* 48 (1) 73.
89. Laganà, A., Bacaloni, A., Fago, G., and Marino, A. (2000) Development of solid extraction unit for determining multiple herbicides in maize. *Chromatographia* 52, 552.
90. Laganà, A., Fago, G., Fasciani, L., Marino, A., and Mosso, M. (2000) Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta* 414, 79.
91. Landberg T., and Greger M. (2002) Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *Plant Physiol.* 159, 69.
92. Lau SMC., and O'Keefe DP., (1996) Analysis of herbicide metabolism by monocot microsomal cytochrome P450. In. *Methods in Enzymology*: Academic Press. p 235.
93. Laverrière PH., et Zech B., (1992) Manager : Herbicide Maïs. *Phytoma*. La défense des végétaux, N°445.
94. Lay, M.M., and Niland, A. M. (1983) The herbicidal mode of action of R-40244 and its absorption by plants. *Pestic Biochem Physiol.* 19, 337.
95. Lederer B. and Böger P. (2003) Binding and protection of porphyrins by glutathione S-transferases of *Zea mays* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1621, (2), 226.

96. Lehnen, L. P., Sherman, T. D., Becerril, J., and Duke, S. O. (1990) Tissue and cellular localization of acifluorfen-induced porphyrins in cucumber cotyledons. *Pestic Biochem Physiol* 37, 239.
97. Li, X., Volrath, S. L., Nicholl, D. B. G., Chilcott, C. E., Johnson, M. A., Ward, E. R., and Law, M. D. (2003) Development of Protoporphyrinogen Oxidase as an Efficient Selection Marker for *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize. *Plant Physiol.* 133, 736-747.
98. Liang B., Lu P., Li H., Li R., Li S. and Huang X., (2009) Biodegradation of fomesafen by strain *Lysinibacillus* sp. ZB-1 isolated from soil. *Chemosphere* 77 (11) 1614.
99. Lichtenthaler, H. K., and Lester Packer and Roland, D. (1987) [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *In Methods in Enzymology* Vol. 148 p. 350.
100. Lichtenthaler, H. K., and Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Society Trans.* 11, 591 - 592.
101. Liddell, P. A., Zárate, X., Moore, A. L., Moore, T. A., and Gust, D. (2000) Synthesis of a carotenobenzoporphyrin from a meso-diphenylporphyrin. *Tetrahedron Lett* 41, 9661.
102. Lützow, M., Haaf, F., Englert, G., Beyer, P., and Kleinig, H. (1996) NADPH and protoporphyrin IX dependent conversion of violaxanthin to a Retro-carotenoid in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts in vitro. *Phytochem* 41, 729.
103. Lydon, J., and Duke, S. O. (1988) Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the p-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. *Pestic Biochem Physiol* 31, 74.
104. Macherel D., Nurit F., Lescure AM., and Tissut M., (1986a) Effects of carbanilates on the growth and development of cell suspension cultures of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol. Plant.*; 66,536-542.
105. Macherel D., Tissut M., Nurit F., Ravanel P., Bergon M., and Calmon JP., (1986b) Inhibitory action of an isopropyl carbanilate series on mitosis, respiration and photosynthesis. *Physiol. Vég.*, 24, 97-107.
106. Macherel, D., Ravanel, P., and Tissut, M. (1982) Effects of herbicidal carbamates on mitochondria and chloroplasts. *Pestic Biochem Physiol.* 18, 280.
107. Malenčić D., Vasić D., Popović M., and Dević D. (2004) Antioxidant Systems in Sunflower as Affected by Oxalic Acid. *Biologia Plantarum.* 48, 243.
108. Marcacci, S., Raveton, M., Ravanel, P., and Schwitzguébel, J.-P. (2006) Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environ Exp Bot* 56, 205.
109. Mark, N. M., Inna, K., and Zvi, C. (1996) Spectrophotometric Analysis of Carotenoids in Plant Extracts Based on Elimination of Chlorophyll Absorption. *Phytocheml Analysis* 7, 294-299.
110. Masuda, T., Kouji, H., and Matsunaka, S. (1990) Diphenyl ether herbicide-decreased heme contents stimulate 5-aminolevulinic acid synthesis. *Pestic Biochem Physiol.* 36, 106.
111. Matringe, M., and Scalla, R. (1988) Effects of acifluorfen-methyl on cucumber cotyledons: Porphyrin accumulation. *Pestic Biochem Physiol* 32, 164
112. Matringe, M., and Scalla, R. (1988) Studies on the Mode of Action of Acifluorfen-Methyl in Nonchlorophyllous Soybean Cells: Accumulation of Tetrapyrroles. *Plant Physiol.* 86, 619-622.
113. Matringe, M., Clair, D., and Scalla, R. (1990) Effects of peroxidizing herbicides on protoporphyrin IX levels in non-chlorophyllous soybean cell culture. *Pestic Biochem Physiol* 36, 300.

114. Matringe, M., Dufour, J. L., Lherminier, J., and Scalla, R. (1986) Characterization of the mode of action of the experimental herbicide LS 82-556: [(S)3-N-(Methylbenzyl)carbamoyl-5-propionyl-2,6-lutidine]. *Pestic Biochem Physiol* 26, 150.
115. Matthies, M., Klasmeier, J. R., Beyer, A., and Ehling, C. (2009) Assessing Persistence and Long-Range Transport Potential of Current-Use Pesticides. *Environ Sci Technol*. 2009, 43 (24), 9223–9229.
116. Mazzella, N., Dubernet, J.-F., and Delmas, F. (2007) Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers: Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments. *Chromatog A* 1154, 42.
117. Menard, C., Heraud, F., Nougadere, A., Volatier, J.L., and Leblanc, J.C. (2008) Relevance of integrating agricultural practices in pesticide dietary intake indicator. *Food Chemical Toxicol* 46, 3240.
118. Mezcua, M., Malato, O., Garcia-Reyes, J. F., Molina-Diaz, A., and Fernandez-Alba, A. R. (2008) Accurate-Mass Databases for Comprehensive Screening of Pesticide Residues in Food by Fast Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chem.* 81, 913.
119. Millet J. C., (1992a) Advantages of the aclonifen + oxadiazon combination for weed control in sunflower. 15. Conference du COLUMA. Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Versailles (France).
120. Millet J.C., (1992b) Advantages of the aclonifen + oxadiazon mixture for weed control in potato crops *Galium aparine*, *Solanum nigrum*. Couloume, B.; 15. Conférence du COLUMA. Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Versailles (France).
121. Millet J. C., (1992c) Interet de l'association Aclonifen+Oxadiazon pour le désherbage de la pomme de terre. 15. Conférence du COLUMA. Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Versailles (France).
122. Millet J. C., (1992d) Advantages of aclonifen alachlor association for weed control in maize crops. 15. Conférence du COLUMA. Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Versailles (France).
123. Mircovich, C. (Centre Technique Interprofessionnel des Oleagineux Metropolitains, Paris (France)) ; Regnault, Y. ; Seizième conférence du COLUMA. Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Reims (France), 6-8 Dec 1995.
124. Moreland, D. E., and Huber, S. C. (1979) Inhibition of photosynthesis and respiration by substituted 2,6-dinitroaniline herbicides: III. Effects on electron transport and membrane properties of isolated mung bean mitochondria. *Pestic Biochem Physiol*. 11, 247-257.
125. Moster, J. B., and Quackenbush, F. W. (1952) The effects of temperature and light on the carotenoids of seedlings grown from three corn hybrids. *Arch Biochem Biophys* 38, 297.
126. Moster, J. B., Quackenbush, F. W., and Porter, J. W. (1952) The carotenoids of corn seedlings. *Arch Biochem Biophys*. 38, 287.
127. Mwense M., Wang, X.Z., Buontempo F. V., Horan N., Young A., and Osborn D. (2004) Prediction of Noninteractive Mixture Toxicity of Organic Compounds Based on a Fuzzy Set Method. *Chem Information Computer Sci.* 44, 1763.
128. Nandihalli U.B, Duke M.V., and Duke S. O. (1992) Quantitative structure-activity relationships of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting diphenyl ether herbicides. *Pestic Biochem Physiol*. 43, 193.

129. Nandihalli U. B., Duke, M. V., and Duke, S. O. (1993) Prediction of RP-HPLC log P from semiempirical molecular properties of diphenyl ether and phenopylate herbicides. *Agric Food Chem.* 41, 582.
130. Neufeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., and Bieseler, B. (1997) Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *Mol Biol.* 274, 446.
131. Niki Y., and Kuwatsuka S., (1976) Degradation of Diphenyl ether herbicides in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*; 22(3)223-232.
132. Ohyam'a H. and Kuwatsuka S., (1983) Degradation of Bifenox, a Diphenyl Ether Herbicide, Methyl 5-(2,4-Dichlorophenoxy)-2-Nitrobenzoate, in Soils. *Pesticide Sci.* 8 17-25.
133. Orr, G. L., and Hess, F. D. (1982) Mechanism of Action of the Diphenyl Ether Herbicide Acifluorfen-Methyl in Excised Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Cotyledons: Light activation and the subsequent formation of lipophilic free radicals. *Plant Physiol.* 69, 502-507
134. Owen R. E. and W. J. (1986) Comparison of glutathione S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta* 169, 208-215.
135. Öztetik E. (2008) A Tale of Plant Glutathione S-Transferases: Since 1970. *Bot Rev.* 74, 419.
136. Pannacci, E., Graziani, F., and Covarelli, G. (2007) Use of herbicide mixtures for pre and post-emergence weed control in sunflower (*Helianthus annuus*). *Crop Protection* 26, 1150.
137. Patricia E.G. and John E.M., (1986) Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone-treated dark-grown barley. *Eur Biochem* 160 (1) 117-121.
138. Paul, Y., and Gupta, S. (1988) Effect of kinetin (6-furfurylaminopurine) on changes in membrane lipids in relation to growth of isolated cotyledons of vegetable marrow (*Cucurbita pepo* L). *Plant Sci.* 55, 87.
139. Paul, Y., Kaur, S., and Sharma, B. N. (1985) Effect of kinetin (6-furfuryl aminopurine) on changes in lipids in relation to growth of excised cotyledons of squashmelon (*Citrullus vulgaris* var. *Fistulosus*). *Plant Sci.* 41, 193.
140. Pfeifer F., Schacht S., Klein J. and Truper H.G., (1989) Degradation of Diphenylether by *Pseudomonas-Cepacia*. *Arch Microbiol.* 152 (6) 515-519.
141. Pfeifer F., Truper H.G., Klein J. and Schacht S., (1993) Degradation of Diphenylether By *Pseudomonas-Cepacia* Et4 -Enzymatic Release of Phenol From 2,3-Dihydroxydiphenylether. *Arch Microbiol.* 159 (4) 323-329.
142. Pflugmacher S., Schröder P., and Sandermann H. (2000) Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochem.* 54, 267.
143. Poovey G.A., Skogerboe G.J. and Getsinger D.K., (2004) Efficacy of AVAST! fluridone formulation against Eurasian Watermilfoil and Non target submersed plants. *Aquatic Plant Control research Program.*
144. Porra, R. J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. [Review]. *Photosynthesis Res.* 73, 149-156.
145. Prade, L., Huber, R., and Bieseler, B. (1998) Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase - explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure.* 6, 1445.
146. Raveton M., Ravanel P., Kaouadji M., Bastide J., and Tissut M. (1997) The Chemical Transformation of Atrazine in Corn Seedlings. *Pestic Biochem Physiol.* 58, 199.

147. Rebeiz, C. A., Mattheis, J. R., Smith, B. B., Rebeiz, C. C., and Dayton, D. F. (1975) Chloroplast biogenesis: Biosynthesis and accumulation of Mg-protoporphyrin IX monoester and longer wavelength metalloporphyrins by greening cotyledons. *Arch Biochem Biophys.* 166, 446.
148. Retzlaff, K., and Böger, P. (1996) An Endoplasmic Reticulum Plant Enzyme Has Protoporphyrinogen IX Oxidase Activity. *Pestic Biochem Physiol.* 54, 105.
149. Riechers, D. E., Irzyk, G. P., Jones, S. S., and Fuerst, E. P. (1997) Partial Characterization of Glutathione S-Transferases from Wheat (*Triticum* spp.) and Purification of a Safener-Induced Glutathione S-Transferase from *Triticum tauschii*. *Plant Physiol.* 114, 1461-1470.
150. Rios-Gonzalez K., Erdei L., and Lips S. H. (2002) The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Sci.* 162, 923.
151. Robert E. (1996) Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiol Plant.* 98, 594-604.
152. Routaboul, J. M., Nurit, F., Ravanel, P., and Tissut, M. (1990) Effects of bifenox and oxadiazon on isolated chloroplasts, plant mitochondria and leaf pieces. *Pestic Sci.* 30, 149-158.
153. Ruelle P., (2000) The n-octanol and n-hexane/water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics. *Chemosphere.* 40, 457.
154. Sandmann G., (2009) Evolution of carotene desaturation: The complication of a simple pathway. *Arch Biochem Biophys.* 483, (2) 169.
155. Sandmann G., Römer S. and Fraser P. D., (2006) Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering.* 8, (4), 291.
156. Sato, R., Nagano, E., Oshio, H., and Kamoshita, K. (1988) Activities of the N-phenyl imide S-23142 in carotenoid-deficient seedlings of rice and cucumber. *Pestic Biochem Physiol.* 31, 213.
157. Schalk M., Pierrel M.A., Zimmerlin A., Batard Y., Durst F., and Werck-Reichhart D. (1997) Xenobiotics: Substrates and inhibitors of the plant cytochrome P450. *Envir Sci Pollut Res.* 4, 229.
158. Schauer F., Henning K., Pscheidl H., Wittich R. M., Fortnagel P., Wilkes H., Sinnwell V. and Francke W., (1995) Biotransformation of diphenyl ether by the yeast *Trichosporon beigelii* SBUG 752. *Biodegradation.* 6 (2) 173.
159. Schiff, J. A. (1981) Evolution of the control of pigment and plastid development in photosynthetic organisms. *Biosystems.* 14, 123.
160. Schröder, P., Lamoureux, G. L., Rusness, D. G., and Rennenberg, H. (1990) Glutathione S-transferase activity in spruce needles. *Pestic Biochem Physiol* 37, 211.
161. Sherman, T. D., Duke, M. V., Clark, R. D., Sanders, E. F., Matsumoto, H., and Duke, S. O. (1991) Pyrazole phenyl ether herbicides inhibit protoporphyrinogen oxidase. *Pestic Biochem Physiol.* 40, 236.
162. Shimabukuro, R. H., Frear, D. S., Swanson, H. R., and Walsh, W. C. (1971) Glutathione Conjugation: An Enzymatic Basis for Atrazine Resistance in Corn. *Plant Physiol.* 47, 10-14.
163. Shimabukuro, R. H., Lamoureux, G. L., Swanson, H. R., Walsh, W. C., Stafford, L. E., and Frear, D. S. (1973) Metabolism of substituted diphenylether herbicides in plants. II. Identification of a new fluorodifen metabolite, S-(2-nitro-4-trifluoromethylphenyl)-glutathione in peanut. *Pestic Biochem Physiol.* 3, 483.

164. Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R., and Walsh, W. C. (1970) Glutathione Conjugation: Atrazine Detoxication Mechanism in Corn. *Plant Physiol.* 46, 103-107.
165. Sicbaldi, F., Sarra, A., Mutti, D., and Bo, P. F. (1997) Use of gas-liquid chromatography with electron-capture and thermionic-sensitive detection for the quantitation and identification of pesticide residues. *Chromatog A.* 765, 13.
166. Siminszky B. (2006) Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem Rev.* 5, 445.
167. Srinivasan L., Mathew N., and Muthuswamy K. (2009) In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors. *Parasitology Res.* 105, 1179.
168. Tomlin C.D.S., (2006) The pesticide manual. Fourteenth Edition. Published by BCPC (British Crop Production Council). Hampshire, UK.
169. Tissut, M., Delval, J. M., and Ravanel, P. (2006) Plantes, herbicides et désherbage ACTA, Paris, France.
170. Toneva, V. T., Shalygo, N. V., Voronetskaya, V. V., Averina, N. G., Gechev, T. S., and Minkov, I. N. (2002) Investigation of the porphyrins accumulation in barley leaves incubated with Mn²⁺ cations and [delta]-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Physiology.* 159, 1047.
171. Topal A., Adams N., Hodgson E., and Kelly SL. (1996). In vitro metabolism of atrazine by tulip cytochrome P450. *Chemosphere* 32(7):1445.
172. Tripathy, B. C., Mohapatra, A., and Gupta, I. (2007) Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767, 860.
173. Umeno D., Tobias A.V. and Arnold F.H., (2005) Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69 (1) 51–78.
174. Unger, T. A. (1996) Chemical functions. In Pesticide Synthesis Handbook p. 902-1073, William Andrew Publishing, Park Ridge, NJ.
175. Vischetti, C., Marucchini, C., Leita, L., Cantone, P., Danuso, F., and Giovanardi, R. (2002) Behaviour of two sunflower herbicides (metobromuron, acetonifene) in soil. *European Agronomy.* 16, 231.
176. Walter, G., and Shalygo, N. V. (1997) Location and fate of protoporphyrin IX accumulated in etiolated leaves and roots of Zea mays L. and Pisum sativum L. *Journal of Photochem and Photobiol B: Biology.* 40, 175.
177. Wang, J., Leung, D., and Chow, W. (2009) Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLC QqTOF MS for the Determination of 148 Pesticides in Berries. *Agric Food Chem.* 26:58(10):5904-25.
178. Weinstein, J. D., and Castelfranco, P. A. (1977) Protoporphyrin IX biosynthesis from glutamate in isolated greening chloroplasts. *Arch Biochem Biophys.* 178, 671.
179. Werck-Reichhart D., Hehn, A., and Didierjean L. (2000) Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trend Plant Sci.* 5, 116.
180. Witkowski, D. A., and Halling, B. P. (1989) Inhibition of Plant Protoporphyrinogen Oxidase by the Herbicide Acifluorfen-Methyl. *Plant Physiol.* 90, 1239-42.
181. Yanase, D., and Andoh, A. (1989) Porphyrin synthesis involvement in diphenyl ether-like mode of action of TNPP-ethyl, a novel phenylpyrazole herbicide. *Pestic Biochem Physiol* 35, 70.
182. Young, D. A., Rudzik, M. B., and Marrs, B. L. (1992) An overlap between operons involved in carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in Rhodobacter capsulatus. *FEMS Microbiol Lett.* 95, 213.
183. Zablotowicz R. M., Hoagland R. E., Locke M. A., and Hickey W. J. (1995) Glutathione-S-Transferase Activity and Metabolism of Glutathione Conjugates by Rhizosphere Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1054-1060.

Références

184. Zachariah V.T., Walsh-Sayles N., and Singh B.R. (2000) Isolation, purification, and characterization of glutathione S-transferase from oat (*Avena sativa*) seedlings. *Prot Chem.* 19, 425-430.
185. Zech B., (1993) Phare: Désherbant tournesol et pomme de terre. *Phytoma.* La défense des végétaux, N : 446.

ABSTRACT:

Title: Mode of action and fate of the herbicide aclonifen

Abstract: The herbicide aclonifen is one of the members of the diphenylethers chemical family. Its substitution is specific with a -Cl, a -NO₃ and a -NH₂ on the same phenyl ring. The NH₂ radical might be involved in the herbicidal mode of action. The herbicidal symptoms on several plants and the cellular and biochemical modes of action were studied. All this showed that two targets were involved, for a same concentration carotenoid biosynthesis inhibition and membrane disruption due to an O₂¹⁻ emission depending on the presence of protoporphyrin IX issued from chlorophyll synthesis inhibition. Theoretically, these two types of biochemical effects are complementary as one leads to the formation of a membrane disruptor (O₂¹⁻) and the other suppresses a membrane scavenger (carotenoids). The agronomical features of this herbicide have been studied in the greenhouse or in culture chambers, on several plant species among which sunflower, corn, rape and adventitious species such as Ray-grass, white mustard, pigweed... With the use of ¹⁴C aclonifen, the uptake rate was measured on these plants, either through roots or on isolated leaves. High uptake rates were observed on the two types of organs depending evidently from the appropriate additives. This lipophilic herbicide (measured log P = 3.7) has its target located in the leaves. However, the most appropriate treatment strategy is a pre-emergence.....on the soil. Aclonifen is adsorbed on the upper soil layer and partition equilibrium is obtained with water which enters the roots. A quantitative estimation of the sensitivity of each studied species was tentatively carried out, based on 4 features of the herbicide action: 1) the minimal lethal concentration [C]_c of the herbicide inside the leaves (named "critical concentration"), 2) the ratio, **T**, between the concentrations in the roots and in the leaves of the same plant, 3) the ratio, **A**, between the concentrations in the roots and in the surrounding soil, 4) the rate Mt of the herbicide inactivation in the plant. The concentration [C]_s required inside the soil for obtaining the herbicide effect is obtained from the equation: $[C]_s = [C]_c \times T \times A \times M$. This calculation showed that the values of [C]_s were quite similar for several plants although the critical leaf concentration [C]_c was not the same. In sunflower, where aclonifen is readily transformed into inactive, hydrophilic conjugates, the value of [C]_s is very high and cannot be, in fact, reached under field conditions. In this plant, powerful herbicide segregation occurs also inside the root, reinforcing its selective resistance.

Keywords: Aclonifen, mode of action, chlorophylls, carotenoids, selectivity, rape sunflower, transport, penetration

RESUME

Titre : Etude du mode d'action et du devenir d'un herbicide : l'aclonifen

Résumé : L'aclonifen est un herbicide appartenant à la famille chimique des diphényléthers, avec une substitution spécifique, ne portant que sur un des phényles et rassemblant un Cl, un NO₃ mais aussi NH₂ qui semble intervenir dans le mode d'action. L'étude des symptômes herbicides de cette molécule sur divers types de plantes puis celle de son mode d'action biochimique et cellulaire fait apparaître des mécanismes d'atteinte originaux. Pour la même concentration deux phénomènes ont lieu : la voie de synthèse des caroténoïdes des plastides est inhibée et il y a une émission d'O₂¹⁻ découlant de l'excitation lumineuse de la protoporphyrine IX issue du blocage de la voie de biosynthèse de la chlorophylle. Ces deux types d'effet sont, en théorie, complémentaires car ils rassemblent la production de radicaux toxiques pour les membranes biologiques et la suppression de la biosynthèse de composés protégeant celles-ci. Le comportement agronomique de cet herbicide a été étudié sur des systèmes simplifiés en serre et en salle conditionnée sur plusieurs végétaux cultivés dont le tournesol, le maïs et le colza et sur plusieurs de leurs plantes adventices majeures (vulpin, moutarde blanche, chénopode,...). Sa capacité de pénétration dans ces plantes, par les racines d'une part, et par les parties aériennes, de l'autre a été comparée en utilisant l'aclonifen ¹⁴C. Cette étude fait apparaître qu'une intense pénétration est possible par les deux voies, avec des flux qui dépendent évidemment de la formulation. Ce comportement est lié à la forte lipophilie de cette molécule, qui a été vérifiée et indique un log P proche de 3,7, plus réaliste que la valeur de 4,37 indiquée initialement. Pour cet herbicide dont l'espace-cible se limite aux parties aériennes, la voie d'application agronomique la plus favorable est celle d'un traitement du sol, en prélevée. L'herbicide, absorbé sur les horizons très superficiels du sol subit un équilibre de partition avec l'eau du sol d'où il pénètre dans les racines. Nous avons tenté d'élaborer un système simple d'évaluation de la sensibilité des plantes étudiées en considérant 4 sites impliqués dans l'ensemble du processus : 1) la concentration " critique" de l'espace cible (les feuilles) qui correspond à la valeur minimale pour obtenir l'effet létal $[C]_c$, 2) le rapport des concentrations entre racines et feuilles qui témoigne d'un facteur de transfert T , 3) la capacité de la racine à concentrer l'herbicide à partir d'un sol A et, 4) la capacité de la plante à inactiver la matière active M . On peut regrouper ces 4 facteurs pour évaluer la concentration " critique" de l'herbicide dans le sol par une formule de type $[C]_s = [C]_c \times T \times A \times M$. Les valeurs obtenues pour $[C]_s$ sont semblables pour un grand nombre d'adventices étudiées, malgré des différences nettes du $[C]_c$. Le tournesol bénéficie d'une sélectivité puissante dont nous avons montré qu'elle est issue d'une capacité très active de conjugaison de l'herbicide, d'un potentiel de ségrégation racinaire également remarquable et d'un effet de positionnement, associé à la présence d'une racine-pivot dont le rôle dans l'absorption de l'eau pourrait expliquer ce phénomène.

Mots clés : Aclonifen, mode d'action, chlorophylles, caroténoïdes, sélectivité, pénétration, colza, tournesol, transferts